

- For more records, click the Records link at page end.
- To change the format of selected records, select format and click Display Selected.
- To print/save clean copies of selected records from browser click Print/Save Selected.
- To have records sent as hardcopy or via email, click Send Results.

<input checked="" type="checkbox"/> Select All				Format
<input checked="" type="checkbox"/> Clear Selections	Print/Save Selected	Send Results	Display Selected	Free

1. ☐ 1/5/1 DIALOG(R)File 352:Derwent WPI (c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

012481628 **Image available**

WPI Acc No: 1999-287736/199927

XRAM Acc No: C99-084975

Alkali protease from Bacillus used in washing powders

Patent Assignee: KAO CORP (KAOS)

Inventor: HITOMI J; KAGEYAMA Y; KUBOTA H; NOMURA M; OKUDA M; SAEKI K;

SHIKATA S; TAKAIWA M

Number of Countries: 024 Number of Patents: 010

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
WO 9918218	A1	19990415	WO 98JP4528	A	19981007	199927 B
AU 9894579	A	19990427	AU 9894579	A	19981007	199936
EP 1029920	A1	20000823	EP 98947770	A	19981007	200041
			WO 98JP4528	A	19981007	
AU 732369	B	20010426	AU 9894579	A	19981007	200128
CN 1280621	A	20010117	CN 98811604	A	19981007	200128
KR 2001030974	A	20010416	KR 2000703728	A	20000407	200163
US 6376227	B1	20020423	WO 98JP4528	A	19981007	200232
			US 2000509814	A	20000406	
US 20020064854	A1	20020530	WO 98JP4528	A	19981007	200240
			US 2000509814	A	20000406	
			US 2001920954	A	20010803	
JP 3479509	B2	20031215	WO 98JP4528	A	19981007	200401
			JP 2000515013	A	19981007	
US 6759228	B2	20040706	US 97509814	A	19971007	200444
			US 2001920954	A	20010803	
			WO 98JP4528	A	20020423	

Priority Applications (No Type Date): JP 97274570 A 19971007

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
WO 9918218	A1	J	71	C12N-015/57	

Designated States (National): AU CN ID JP KR US

Designated States (Regional): AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU
MC NL PT SE

AU 9894579	A			Based on patent WO 9918218
EP 1029920	A1 E	C12N-015/57		Based on patent WO 9918218
				Designated States (Regional): DE DK FR GB NL
AU 732369	B	C12N-015/57		Previous Publ. patent AU 9894579
				Based on patent WO 9918218

CN 1280621	A	C12N-015/57		
KR 2001030974	A	C12N-015/57		
US 6376227	B1	C12N-009/50		Based on patent WO 9918218
US 20020064854	A1	C12N-009/52		Cont of application WO 98JP4528
				Cont of application US 2000509814
JP 3479509	B2	44 C12N-015/09		Based on patent WO 9918218
US 6759228	B2	C12N-009/52		Cont of application US 97509814
				Cont of application WO 98JP4528
				Cont of patent US 6376227

Abstract (Basic): WO 9918218 A1

NOVELTY - An alkali protease is new which is produced by strains of Bacillus. Its ability to digest casein is not inhibited by oleic acid and it has a high stability to oxidising agents.

DETAILED DESCRIPTION - An alkali protease is new which is produced by microorganisms and has the following properties:

(a) it is active over the pH range 4-13 and has at least 80% of its optimum activity over the range pH 6-12;

(b) after 30 minutes at 40 degreesC it is stable over the pH range 6-11;

(c) its isoelectric point is 8.9-9.1;

(d) its ability to digest casein is not inhibited by oleic acid;

(e) it has molecular weight about 43,000 by SDS-PAGE.

INDEPENDENT CLAIMS are included for:

(1) DNA sequences encoding the alkali protease;

(2) microorganisms producing the enzyme; and

(3) washing compositions containing the enzyme.

USE - As an enzyme in washing compositions for use in automatic dishwashers and for washing clothes.

ADVANTAGE - The stability to oxidising agents allows the enzyme to be an effective component of washing compositions including bleaches.

DESCRIPTION OF DRAWING(S) - This shows the relative activity of the enzyme against time (minutes) in the presence of 50mM hydrogen peroxide for (diamonds) the enzyme from strain KSM-KP43; (squares) a commercial washing enzyme (Durazym) (Novo-Nordisk); and (triangles) protease-K (Kao).

pp: 71 DwgNo 3/6

Title Terms: ALKALI; PROTEASE; BACILLUS; WASHING; POWDER

Derwent Class: D16; D25

International Patent Class (Main): C12N-009/50; C12N-009/52; C12N-015/09; C12N-015/57

International Patent Class (Additional): C07H-021/04; C11D-002/42;

C11D-003/00; C11D-003/386; C12N-001/14; C12N-001/16; C12N-001/20;

C12N-001/21; C12N-009/54; C12P-021/06

File Segment: CPI

Derwent WPI (Dialog® File 352): (c) 2004 Thomson Derwent. All rights reserved.

<input checked="" type="checkbox"/> Select All	<input type="checkbox"/> Clear Selections	<input type="checkbox"/> Print/Save Selected	<input type="checkbox"/> Send Results	<input type="checkbox"/> Display Selected	Format
					Free

© 2004 Dialog, a Thomson business

(19)日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11)国際公開番号

第1部門第1区分

WO99/18218

発行日 平成14年8月27日(2002.8.27)

(43)国際公開日 平成11年4月15日(1999.4.15)

(51)Int.Cl.

識別記号

FI

C12N 15/09

ZNA

C12N 15/00

ZNAA

C11D 3/386

C11D 3/386

C12N 1/21

C12N 1/21

9/54

9/54

審査請求 有

予備審査請求 有

(全 66 頁)

出願番号 特願2000-515013(P2000-515013)
(21)国際出願番号 PCT/JP98/04528
(22)国際出願日 平成10年10月7日(1998.10.7)
(31)優先権主張番号 特願平9-274570
(32)優先日 平成9年10月7日(1997.10.7)
(33)優先権主張国 日本(JP)
(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), AU, CN, ID, JP, KR, US

(71)出願人 花王株式会社
東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番10号
(72)発明者 高岩 美喜雄
栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会社 研究所内
(72)発明者 奥田 光美
栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会社 研究所内
(72)発明者 佐伯 勝久
栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会社 研究所内
(74)代理人 弁理士 有賀 三幸 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アルカリプロテアーゼ

(57)【要約】

本発明は、次の性質を有するアルカリプロテアーゼ、これをコードする遺伝子、これを産生する微生物及びこれを含む洗浄剤組成物に関する。(i) pH4~13の広い範囲で作用し、pH6~12で最適pH活性値の80%以上を示す；(ii) 40℃、30分の処理条件でpH6~11の範囲で安定である；(iii) 等電点8.9~9.1付近；(iv) オレイン酸によってカゼイン分解活性の阻害を受けない。このアルカリプロテアーゼは、各種の界面活性剤に極めて安定であり、脂肪酸耐性を有し、かつ酸化剤にも高い安定性を有することから、漂白剤成分を含有する自動食器洗浄機用洗剤及び衣料用洗浄剤用の酵素として有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の理化学的性質を有するアルカリプロテアーゼ。

(i) 作用 pH 範囲：

pH 4～13 の広い範囲で作用し、pH 6～12 で最適 pH 活性値の 80% 以上を示す。

(ii) 安定 pH 範囲：

40℃、30 分の処理条件で pH 6～11 の範囲で安定である。

(iii) 等電点：

8.9～9.1 付近。

(iv) 脂肪酸の影響：

オレイン酸によってカゼイン分解活性の阻害を受けない。

【請求項2】 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による推定分子量が約 43000 である請求項1記載のアルカリプロテアーゼ。

【請求項3】 配列番号1又は2で示されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の1若しくは2以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有するものである請求項1又は2記載のアルカリプロテアーゼ。

【請求項4】 請求項1～3のいずれか1項記載のアルカリプロテアーゼをコードする遺伝子。

【請求項5】 請求項1～3のいずれか1項記載のアルカリプロテアーゼを産生する微生物。

【請求項6】 請求項1～3のいずれか1項記載のアルカリプロテアーゼを含有する洗浄剤組成物。

ロテアーゼを見出した。

すなわち、本発明は、下記の理化学的性質を有するアルカリプロテアーゼを提供するものである。

(i) 作用 pH 範囲：

pH 4～13 の広い範囲で作用し、pH 6～12 で最適 pH 活性値の 80% 以上を示す。

(ii) 安定 pH 範囲：

40℃、30 分の処理条件で pH 6～11 の範囲で安定である。

(iii) 等電点：

8.9～9.1 付近。

(iv) 脂肪酸の影響：

オレイン酸によってカゼイン分解活性の阻害を受けない。

また、本発明は、上記アルカリプロテアーゼをコードする遺伝子を提供するものである。

また、本発明は、上記アルカリプロテアーゼを産生する微生物を提供するものである。

さらに本発明は、上記アルカリプロテアーゼを含有する洗浄剤組成物を提供するものである。

発明を実施するための最良の形態

本発明のアルカリプロテアーゼは、前記 (i)～(iv) の理化学的性質を有するが、特に (iv) の性質は重要である。すなわち、オレイン酸は皮脂の成分の一つであり、オレイン酸 10mM 存在下でも、オレイン酸不存在下の場合と同等のカゼイン分解活性を保持している。

本発明のアルカリプロテアーゼとしては、(v) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) による推定分子量が約 43,000 のものが好ましい。

さらに、上記 (i)～(v) の性質以外に下記 (vi)～(ix) の性質を有するアルカリプロテアーゼが特に好ましい。

(vi) 作用温度及び最適温度：

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は洗浄剤配合用酵素として有用なアルカリプロテアーゼ、それをコードする遺伝子、該アルカリプロテアーゼを産生する微生物及び該アルカリプロテアーゼを含有する洗浄剤組成物に関する。

背景技術

プロテアーゼは、衣料用洗剤をはじめとする各種洗剤、化粧品、浴用剤、食品改質剤、消化助剤あるいは消炎剤といった医薬品等の多分野で利用されてきた。

その中でも最も大量に工業生産され市場規模が大きいのは洗剤用プロテアーゼであり、例えばアルカラゼ、サビナーゼ (ノボ・ノルディスク社製)、マクサカル (ジェネンコ社製)、ブラップ (ヘンケル社製) 及びプロテアーゼ K (KAP; 花王社製) などが知られている。

一方、現在もより性能の向上した洗剤用酵素の探索が試みられており、熱及び界面活性剤に対する安定性の高い酵素 (特開平 6-70765 号公報等)、ケラチンなどの不溶性蛋白質に作用しかつ高い比活性を有する酵素 (特開平 9-121855 号公報等)、低温域での活性に優れた酵素 (特開平 5-211868 号公報、特開平 9-121856 号公報等) 及び酸化剤に対する安定性を向上させる方法 (欧州特許第 0130756 号公報) 等が開示されている。

ところで、衣料等の汚れは蛋白質だけでなく、脂質、固体粒子など複数の成分が含まれていることがほとんどであり、かかる実際の複合汚れに対して洗浄力の高い洗剤が望まれている。これに対しては、通常複数の酵素、複数の界面活性剤の配合がなされている。

しかしながら、複数の酵素を配合したところで、その配合した個々の酵素が複合汚れの条件下で安定で、かつ十分な活性を維持していなければ、その作用は十分に発揮されない。この点で従来の酵素は必ずしも十分ではなかった。

発明の開示

本発明者は、高濃度の脂肪酸存在下でもカゼイン分解活性を保持し、蛋白だけでなく皮脂等の汚れのある複合汚れ条件下でも優れた洗浄性を有するアルカリ

作用最適温度は 60℃～70℃であるが、20℃以下の低温でも作用する。

(vii) 金属イオンの影響：

Hg²⁺ 及び Cu²⁺ イオンでは活性が阻害され、Ca²⁺ イオンでは熱安定性が向上する。

(viii) 阻害剤の影響：

エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 及び p-クロロマーキュリー安息香酸 (PCMB) では活性は阻害されないが、ジソプロピルフルオロリン酸 (DFP) 及びフェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF) では活性は阻害される。

(ix) 界面活性剤耐性：

直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム、ポリオキシエチレンアルキル硫酸ナトリウム、ドデシル硫酸ナトリウム、α-オレフィンスルホン酸ナトリウム及び α-スルホ脂肪酸エステルで活性は阻害されない。

本発明のアルカリプロテアーゼとしては、配列番号1又は2に示すアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の1若しくは2以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有するものが好ましい。配列番号1と2とは、配列番号2における3位リジンが配列番号1では欠失している点で異なるのみである。配列番号1及び2における Xaa は、任意のアミノ酸を示すが、各位の Xaa の好ましいアミノ酸を配列番号2における位置で下記の表に示す。

24位	Ser又はAsn	30位	Gly又はAsp
33位	Asn又はThr	47位	Ala又はVal
48位	Lys又はSer	54位	Gly又はArg
71位	Pro又はLeu	75位	Gln又はLeu
90位	Ile又はVal	103位	Gln又はLys
106位	Lys又はThr	129位	Lys又はGln
131位	Ala又はLys	132位	Thr又はVal
133位	Ser又はArg	134位	Thr又はSer
147位	Ile又はLys	149位	Arg又はLys
161位	Glu又はThr	166位	Val又はLeu
173位	Lys又はAsn	184位	Gln又はGlu
188位	Phe又はTyr	189位	Ala又はVal
190位	Ile又はAla	195位	Leu又はHis
287位	Ser又はAla	307位	Gly又はSer
325位	Tyr又はPhe	370位	Gly又はArg
432位	Phe又はTyr	502位	Ile又はVal
532位	Ser又はAla	542位	Ser又はThr
585位	Gln又はArg	592位	Thr又はSer
593位	Ser又はAla	595位	Tyr又はPhe
596位	Asn又はAsp	597位	Asp又はAsn
612位	Ala又はSer	633位	Thr又はAsn

本発明アルカリプロテアーゼにおける前記欠失、置換又は付加は、アルカリプロテアーゼ活性を失わない限り特に制限されないが、配列番号1又は2で示されるアミノ酸配列の好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上が保存されているものが好ましい。

表 1

	KP43	KP1790	KP9860
A. 形態学的性質			
(a) グラム染色	陽性	陽性	陽性
(b) アミノペプチダーゼ	不定	不定	不定
(c) 運動性	有する	有する	有する
(d) 鞭毛	周鞭毛	周鞭毛	周鞭毛
(e) 胞子 (有無、形、位置、膨らみ)	有胞子、精円形、中央、無し	有胞子、精円形、中央、無し	有胞子、精円形、端-中央、有り
B. 生理学的性質			
(a) 硝化作用の還元	陰性	陰性	陰性
(b) インドール生成	陰性	陰性	陰性
(c) 生育のpH範囲	pH 6.2~11.7で生育、pH 8~11.0で良好に生育、7%以上NaCl含有培地上で生育できない	pH 6.2~11.7で生育、pH 8~11.0で良好に生育、7%以上NaCl含有培地上で生育できない	pH 6.2~11.0で生育、pH 9付近で良好に生育、7%以上NaCl含有培地上で生育できない
(d) 塩化ナトリウムに対する耐性	10~40℃	10~40℃	20~40℃
(e) 生育の温度範囲	陰性	陰性	陰性
(f) β-ガラクトシダーゼ	陰性	陰性	陰性
(g) アルギニンヒドロラーゼ	陰性	陰性	陰性
(h) リジンヒドロラーゼ	陰性	陰性	陰性
(i) オキシダーゼ	陰性	陰性	陰性
(j) ケン酸の利用	陰性	陰性	陰性
(k) 尿素の利用	陰性	陰性	陰性
(l) カタラーゼ	陰性	陰性	陰性
(m) グルコース及び硝酸塩からのガスの生成	陰性	陰性	陰性
(n) 嫌気条件下での生育	陰性	陰性	陰性
(o) VPテスト	陰性	陰性	陰性
(p) 糖からの酸生成			
D-グルコース	+	+	+
レーブローズ	+	+	+
D-キシロース	+	+	+
D-マンニトール	+	+	+
D-ガラクトース	+	+	+
シュークロース	+	+	+
D-マンノース	+	+	+
イノシトール	+	+	+
D-ソルビトール	+	+	+
トレハロース	+	+	+
ラクトース	+	+	+
グリセロール	+	+	+
マルトース	+	+	+
D-フラクトース	+	+	+
ラフィノース	+	+	+
メリトイース	+	+	+
デンプン	+	+	+

以上の図学的性質について「Bergey's Manual of Sys

本発明のアルカリプロテアーゼの具体例としては、配列番号3、4又は5で示されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の1若しくは2以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有するアルカリプロテアーゼが挙げられる。

本発明のアルカリプロテアーゼは、例えばバチルス属 (*Bacillus*) に属するアルカリプロテアーゼ生産菌を培養し、その培養物から採取することにより製造することができる。ここで、本発明アルカリプロテアーゼ生産菌としては、バチルス属に属する野生株、及び前記のアミノ酸配列を有するペプチドをコードする遺伝子を有する形質転換体が挙げられる。また、該野生株としては例えば KP43 株、KP1790 株及び KP9860 株が挙げられる。これらの菌株の図学的性質を以下に示す。

tematic Bacteriology」(Williams & Wilkins社、1984年)の記載に準拠検討したところ、上記の3菌株はバチルス属に属することが妥当である。しかし、種については、既知のバチルス属の種の諸性質とは完全に一致しないことから新規な微生物である。そこで上記3菌株を工業技術院生命工学技術研究所 (あて名: 〒305-0046 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号) にバチルス エスピー (*Bacillus* sp.) KSM-KP43 (FERM BP-6532)、バチルス エスピー (*Bacillus* sp.) KSM-KP1790 (FERM BP-6533)、バチルス エスピー (*Bacillus* sp.) KSM-KP9860 (FERM BP-6534) として寄託した (原寄託日: 1996年9月18日)。

上記の菌株を用いて本発明アルカリプロテアーゼを生産するには、菌株を資化性の炭素源、窒素源その他の必須栄養素を含む培地に接種し、常法に従い培養すればよい。

かくして得られた培養液中からのアルカリプロテアーゼの採取及び精製は、一般の酵素の採取及び精製方法に準じて行うことができる。例えば、培養液から遠心分離又は濾過することによって菌体を除き、培養上清液から常法の精製手段により目的酵素を得る。このようにして得られる酵素液は、そのまま用いることもできるがさらに公知の方法により精製、結晶化することもできる。

本発明アルカリプロテアーゼは、該アルカリプロテアーゼをコードする遺伝子を取得し、これを用いて組換えベクターを構築し、該組換えベクターを用いて宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養し、培養物からアルカリプロテアーゼを採取することによっても得られる。

本発明アルカリプロテアーゼ遺伝子は、例えば上記3菌株からクローニングすることができる。該クローニング手段としては、既知の手段、例えば (1) 適当な制限酵素による染色体DNAの全分解又は部分分解で得られたDNA断片を適当なベクターに組み込み、大腸菌や枯草菌などに導入し発現させるショットガン法、(2) 適当なプライマーを合成してPCR法で目的とする遺伝子をクローニングする方法等が挙げられる。

本発明アルカリプロテアーゼ遺伝子の塩基配列の一例を配列番号3~5に示す

。該塩基配列は、配列番号3〜5に限定されるものではなく、配列番号1若しくは2に示されたアミノ酸配列をコードする塩基配列、又は該アミノ酸配列の1若しくは2以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加したアミノ酸配列をコードする塩基配列であればよいが、配列番号3〜5で示される塩基配列、又は該塩基配列の1若しくは2以上の塩基が欠失、置換若しくは付加は、前記アミノ酸配列の変異の範囲内であることが好ましい。

前記アルカリプロテアーゼ遺伝子を含む組換えベクターを作製するには、目的とする宿主内で遺伝子を発現するのに適した任意のベクターにアルカリプロテアーゼ遺伝子を組み込めばよい。かかるベクターとしては、大腸菌を宿主とする場合、pUC18、pBR322、pUC19等が挙げられ、枯草菌を宿主とする場合、pUB110等が挙げられる。

かくして得られた組換えベクターを用いて宿主を形質転換するには、常法、例えばプロトプラス法、コンピテントセル法等により行われる。宿主としては、特に制限されないが、微生物が好ましく、バチルス属細菌等のグラム陽性菌：大腸菌 (*Escherichia coli*) 等のグラム陰性菌；サッカロマイセス属酵母、アスペルギルス属カビ等の真菌等が挙げられる。

得られた形質転換体を培養して本発明アルカリプロテアーゼを採取するには、例えば前記の野生株を用いた培養、採取、精製の手段に準じればよい。

本発明のアルカリプロテアーゼは、前記の如く優れたアルカリ耐性を有し、脂質の存在下でも優れたプロテアーゼ活性を有し、さらに酸化剤に対する耐性及び界面活性剤耐性を有するので、各種洗浄剤組成物配合用酵素として有用である。

洗浄剤組成物中への上記アルカリプロテアーゼの配合量は、アルカリプロテアーゼが活性を示す量であれば特に制限されないが、洗浄剤組成物1kg当たり0.1〜5000U、特に1〜500Uが好ましい。

また、本発明のアルカリプロテアーゼ含有洗浄剤組成物には、公知の洗浄剤成分を配合することができ、当該公知の洗浄剤成分としては、WO94/26881の第5頁、右上部、第14行〜右下部、第29行記載のものを使用することができる。

日間培養した。生育した集落の周囲にスキムミルクの分解によって生じた透明帯を指標としてプロテアーゼ生産菌を分離した。その結果、アルカリプロテアーゼ生産菌としてバチルス エスピー-KSM-KP43株、KSM-KPI790株及びKSM-KP9860株を得た。

表 2

スクリーニング用液体集落培地 (pH 1) の組成	
リン酸-カリウム	0.1%
硫酸マグネシウム	0.02%
酵母エキス (ディフコ社製)	0.05%
ケラチン (東京化成社製)	1.0%
グルコース	0.5%
炭酸ナトリウム	0.3%
スクリーニング用寒天平板培地	
ニュートリエントアガー (ディフコ社製)	2.3%
スキムミルク (ディフコ社製)	0.3%
炭酸ナトリウム	1.0%

実施例 2

得られたバチルス エスピー-KSM-KP43株をポリペプトンS1%、酵母エキス0.05%、リン酸1カリウム0.1%、硫酸マグネシウム0.02%、グルコース (別添図) 1%、炭酸ナトリウム (別添図) 0.5%、の組成の液体培地に接種し30℃、24時間培養した。この時の培養上清の酵素濃度は、約1.5U/Lであった。この培養液を4℃で遠心分離し得られた培養上清に攪拌しながら粉砕した炭素を90%飽和濃度になるように添加した。攪拌しながら4℃で一昼夜放置後遠心分離により沈殿を回収し、得られた沈殿を5mMの塩化カルシウムを含む10mMトリス-塩酸緩衝液pH7.5に溶解し、同緩衝液に対して透析した。続いてこの透析内液を5mMの塩化カルシウムを含む10mMトリス-塩酸緩衝液pH7.5で平衡化させたDEAE-Sepharose FF (フ

界面活性剤は、洗浄剤組成物中0.5〜60重量% (以下単に%で示す) 配合され、特に粉体状洗浄剤組成物については10〜45%、液体洗浄剤組成物については20〜50%配合することが好ましい。また、本発明洗浄剤組成物が漂白洗浄剤又は自動食器洗浄機用洗浄剤である場合、界面活性剤は一般に1〜10%、好ましくは1〜5%配合される。

二価金属イオン捕捉剤は、0.01〜50%、好ましくは5〜40%配合される。

アルカリ剤及び無機塩は0.01〜80%、好ましくは1〜40%配合される。

再汚染防止剤は0.001〜10%、好ましくは1〜5%配合される。

本発明のアルカリプロテアーゼ以外にセルラーゼ、アミラーゼ、プロトベクチナーゼ、ペクチナーゼ、リパーゼ、ヘミセルラーゼ、β-グリコシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ等を使用することができる。これらの酵素は0.001〜5%、好ましくは0.1〜3%配合される。

漂白剤 (例えば過酸化水素、過炭酸塩等) は1〜10%配合するのが好ましい。漂白剤を使用するとき漂白活性化剤 (アクチベーター) を0.01〜10%配合することができる。

蛍光剤はビフェニル型蛍光剤 (例えばノバルCBS-X) やスチルベン型蛍光剤 (例えばDM型蛍光剤) 等が挙げられる。蛍光剤は0.001〜2%配合するのが好ましい。

上記の洗浄剤組成物の形態は、例えば液体、粉末、顆粒等とすることができる。また、この洗浄剤組成物は、衣料用洗浄剤、自動食器洗浄機用洗浄剤、排水管洗浄剤、軽微洗浄剤、漂白剤等として使用することができる。

実施例

実施例 1 (アルカリプロテアーゼ生産菌のスクリーニング)

土壌サンプル1gを生理食塩水 (10mL) に懸濁し、80℃で10分間加熱処理を行った後、以下に示した組成を有するプロテアーゼ生産菌液体集落培地へ接種し、20℃で培養を行った。3回程度同培地で増殖を繰り返した後、以下に示した組成を有するプロテアーゼ生産判定プレートに塗抹し、20℃で5〜7

アルマシア社製) カラムを通過させ非吸着成分を回収した。この回収液を2mM塩化カルシウムを含む50mM HEPE緩衝液pH7.5に対して透析し、同緩衝液で平衡化させたSP-セファロースFFカラムを通過させ非吸着成分よりやや遅れて溶出してくる活性成分を回収した。活性回収率15%のこのサンプルを用いてSDSポリアクリルアミド電気泳動を行ったところ単一バンドとして検出された。

実施例 3

得られたバチルス エスピー-KSM-KP1790株及びKSM-KP9860株を実施例2と同様の培地で培養し、実施例2と同様に培養液を精製してアルカリプロテアーゼを採取した。

実施例 4

実施例2及び3で得られたアルカリプロテアーゼの酵素学的性質を検討した。その実験方法及び結果を以下に示す。

1. 実験材料及び実験方法

(1) 活性測定法

(a) カゼイン法

1% (w/v) カゼイン (ハマーシュタイン：メルク社製) を含む50mmol/L各緩衝液1mLを40℃で5分間保温した後、0.1mLの酵素溶液を添加し、40℃で10分間反応を行った。TCA溶液 (0.11mol/Lトリクロロ酢酸：0.22mol/L酢酸ナトリウム：0.33mol/L酢酸) 2mLを添加して反応を停止し、室温で10分間放置した後、酸性蛋白を透過 (No. 2濾紙：ホワットマン社製) した。そして、濾液0.5mLにアルカリ性硝酸試薬 (1% (w/v) 酒石酸カリウム・ナトリウム：1% (w/v) 硫酸銅：2% (w/v) 炭酸ナトリウム：0.1mol/L水酸化ナトリウム=1:1:100 (v/v/v)) 2.5mLを添加し、30℃、10分間保温した後、希釈フェノール試薬 (フェノール試薬 (関東化学社製) をイオン交換水で2倍希釈したもの) 0.25mLを加え、30℃、30分間保温した後、660nmにおける吸光度を測定した。上記の酵素反応系に反応停止液を混合した後、酵素溶液を加えた系をブランクとした。

なお、酵素1単位 (P. U) は、上記の反応条件において1分間に1mmolのチロシンに相当する酪酸性蛋白分解物を遊離する酵素量とした。

(b) 合成基質法

0.9mLの100mmol/Lホウ酸緩衝液 (pH10.0, 2mmol/L塩化カルシウム含有) に50mmol/L合成基質溶液 (サクシニル-アラニル-アラニル-フェニル-ロイシン・パラニトロアニリドをジメチルスルホキシドに溶解) 0.05mLを混合し、30℃で5分間保温した後、0.05mLの酵素溶液を加え、30℃、10分間反応を行った。5% (w/v) クエン酸溶液2mLを添加して反応を停止させ、420nmにおける吸光度を測定した。

なお、酵素1単位 (U) は、上記の反応条件において1分間に1μmolのp-ニトロアニリンを遊離させるのに必要な酵素量とした。

(c) アンソン・ヘモグロビン法

アンソンの方法に従い (M. L. Anson, J. Gen. Physiol. 22, 79 (1938))、尿素を用いて牛血清ヘモグロビンを変性させ、水酸化ナトリウムにてpH10.5とした。この基質溶液 (ヘモグロビンとして2.2%) 0.5mLに酵素液0.1mL ($1.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-3}$ A. U) を添加し25℃にて10分間反応を行い、4.9%のトリクロル酢酸1.0mLを加え、反応を停止した。反応終了後、遠心分離 (3,000rpm, 10分) を行い、その上清液中に含まれる蛋白分解物をフォーリン・ローリー法 (O. H. Lowry, J. Biol. Chem., 193, 265 (1951)) によって定量した。

なお、酵素1単位 (A. U) は、上記の反応条件において1分間に1mmoleのチロシンに相当する酪酸性蛋白分解物を遊離する酵素量とした。

(2) 至適pH

カゼイン1% (w/v) を含む50mmol/Lのブリットン・ロビンソン緩衝液1mLに酵素溶液 (3.0×10^{-4} mP. U) 0.1mLを加え、カゼイン法によって活性測定を行った。

(3) pH安定性

ブリットン・ロビンソン緩衝液 (20mmol/L, 2mmol/L塩化カル

シウム含有) 中に酵素溶液を (8.0×10^{-4} mP. U.) 混合し、40℃、30分間及び10℃、24時間の処理を行った。この処理液を氷冷後、50mmol/Lホウ酸緩衝液で40倍に希釈した後、カゼイン法により残存活性を測定した。

(9) 酸化剤 (過酸化水素) の影響

過酸化水素及び塩化カルシウムを含むブリットン・ロビンソン緩衝液 (最終濃度: 50mmol/L過酸化水素, 2mmol/L塩化カルシウム, 20mmol/Lブリットン・ロビンソン (pH8.0) 2.7mLを30℃、15分間保温した後、0.3mLの酵素溶液を添加した。経時的に、予め準備しておいた5μLのカタラーゼ (ペーリンガー・マンハイム社製: 20mg/mL) 入り試験管に0.8mLサンプリングし、酸化反応を停止させた。そして、各サンプルを2mmol/L塩化カルシウムで適当に希釈した後、合成基質法を用いて残存活性を測定した。

(10) 脂肪酸の影響

1% (w/v) カゼインを含む50mMリン酸緩衝液 (pH7) を基質溶液として、0~10mMのオレイン酸ナトリウム存在下で20℃、15分間反応を行い、カゼイン法で活性測定を行った。

1.1. 実験結果

(1) 至適pH

3種類のプロテアーゼ (KP43, KP1790, KP9860) に及ぼすpHの影響を検討した。至適pHにおける活性を100%とし、各pHでのKP43の相対活性を図1に示した。その結果、いずれのプロテアーゼも、作用最適pHはpH6~12にあり、非常に広いpH領域において高い蛋白分解活性を有することが明らかになった。

(2) pH安定性

処理前の酵素活性を100%とし、40℃で30分間及び10℃で24時間の保存後の、各pHにおけるKP43の残存活性を図2及び3に示した。その結果、40℃、30分間の処理では、いずれもpH6~12の広範囲で安定であり、カルシウムイオンの添加によってpH5における安定性も改善されることが明らかになった。一方、10℃、24時間の処理では、いずれもpH5~12の広範囲で安定であった。

シウム含有) 中に酵素溶液を (8.0×10^{-4} mP. U.) 混合し、40℃、30分間及び10℃、24時間の処理を行った。この処理液を氷冷後、50mmol/Lホウ酸緩衝液で40倍に希釈した後、カゼイン法により残存活性を測定した。

(4) 至適温度

カゼイン1% (w/v) を含有する50mmol/Lホウ酸緩衝液 (pH10.0) 1mL中に、酵素溶液 (2.0×10^{-4} mP. U.) 0.1mLを添加し、10~80℃までの各温度でカゼイン法により活性測定を行った。

なお、活性測定は5mmol/L塩化カルシウムの存在下及び非存在下の両系において行った。

(5) 耐熱性

20mmol/Lホウ酸緩衝液 (pH10.0) 中、5mmol/L塩化カルシウムの存在下及び非存在下の両系において、酵素溶液 (2.5×10^{-4} mP. U.) を加え、各温度で10分間熱処理を行った。氷冷後、50mmol/Lホウ酸緩衝液 (pH10.0) で5倍希釈し、カゼイン法により残存活性の測定を行った。

(6) 金属イオンの影響

1mmol/L各種金属塩を含む20mmol/Lホウ酸緩衝液 (pH10.0) 中に酵素溶液 (4.0×10^{-4} mP. U.) を添加し、30℃、20分間の処理を行った。その後、50mmol/Lホウ酸緩衝液 (pH10.0) で5倍希釈し、カゼイン法により活性の測定を行った。

(7) 阻害剤の影響

10mmol/Lリン酸緩衝液 (pH7.0) に各種阻害剤を所定濃度になるよう調製し、酵素溶液 (1.0×10^{-3} mP. U.) を添加し、30℃、20分間の処理を行った。その後、イオン交換水で20倍希釈し、カゼイン法により残存活性の測定を行った。

(8) 界面活性剤の影響

1%の界面活性剤を溶解した100mmol/Lホウ酸緩衝液に、酵素溶液 (7.0×10^{-4} mP. U.) を添加し、40℃、4時間の処理を行った。その

(3) 至適温度

基質にカゼインを用いて、各々のプロテアーゼに及ぼす温度の影響を検討した。カルシウム無添加系における最高活性を100%とし、各温度におけるKP43の相対活性を図4に示した。この結果から、カルシウムイオン無添加系においては、3種類のプロテアーゼは至適温度を60℃に有することが判った。また、カルシウムイオン添加系によっていずれも至適温度は70℃となり、既存の洗剤用プロテアーゼと同様、カルシウムイオン添加系による至適温度の高温側への移行が認められた。

(4) 耐熱性

30~60℃までの各温度で (pH10.0, 5mmol/L塩化カルシウム添加及び無添加)、10分間の熱処理を行い、残存活性を測定した。未処理時の活性を100%とし、各処理温度におけるKP43の残存活性を図5に示す。その結果、いずれのプロテアーゼも塩化カルシウム無添加系においては、60℃まで安定であり、塩化カルシウム (5mmol/L) の添加により温度安定性は10℃程高温側にシフトすることが明らかになった。市販の洗剤用酵素と比較した場合、最も耐熱性に優れているエスベラーゼに匹敵する耐熱性を保持するものと考えられた。

(5) 金属イオンの影響

4種類のプロテアーゼについて、各種金属塩 (1mmol/L) で20mmol/Lホウ酸緩衝液中 (pH10.0)、30℃、20分間の処理を行い、残存活性を測定した。残存活性は、金属塩無添加系で同様の処理を行った時の酵素活性を100%とする相対値で表わした (表3参照)。その結果、いずれのプロテアーゼも塩化水銀及び硝酸銀による阻害が認められたが、他の各種金属塩に対しては、非常に安定であることが判った。

表 3

金属塩 (1mM)	相 対 活 性 (%)		
	KP43	KP1790	KP9860
無添加	100	100	100
AgNO ₃	66	70	45
NiCl ₂	92	95	95
CaCl ₂	97	95	101
CoCl ₂	91	101	98
FeCl ₃	93	113	95
ZnCl ₂	85	94	91
CuCl ₂	91	96	94
HgCl ₂	38	37	33
MgCl ₂	92	103	100

処理条件: 1mM金属塩、20mMホウ酸緩衝液(pH10.0)30℃、20分

(6) 各種阻害剤の影響

一般的な酵素阻害剤が本発明プロテアーゼに対して与える影響を検討した。10mmol/Lリン酸緩衝液(pH7.0)に各種阻害剤を所定濃度になるように添加し、30℃、20分間の処理を行い、残存活性を測定した。残存活性は、阻害剤無添加系で同様の処理を行った時の酵素活性を100%とする相対値で表わした(表4参照)。この結果から明らかなように、3種類のプロテアーゼはいずれも、セリンプロテアーゼの阻害剤であるジイソプロピルフルオルリン酸(DFP)、フェニルメタンスルホニルフルオリド(PMSF)及びキモスタチンで阻害されることから、活性中心にセリン残基を有するプロテアーゼであると考えられた。また、放線菌由来でセリンプロテアーゼの阻害作用が報告されているアンチバインやロイペプチンによる影響は認められなかった。

残存活性は、処理時間0分での酵素活性を100%とする相対値で表わした(表5参照)。その結果、3種類の酵素は、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸(LAS)をはじめとする界面活性剤に非常に安定であることから、界面活性剤を含有する洗浄剤成分として有用であると考えられた。

表 5

界 面 活 性 剤 (濃度: 1%)	残 存 活 性 (%)		
	KP43	KP1790	KP9860
無添加	100	100	100
直鎖アルキルベンゼン スルホン酸ナトリウム(LAS)	100	88	100
ポリオキシエチレンアルキル 硫酸ナトリウム(ES)	101	102	104
ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)	104	97	103
α -オレフィンスルホン酸 ナトリウム(AOS)	100	111	100
アルキル硫酸ナトリウム(AS)	113	107	107
α -スルホ脂肪酸エステル (α -SFE)	112	113	105
ソフタノール70H	109	109	104

処理条件: 1%界面活性剤、100mMホウ酸緩衝液(pH10.0)
40℃、4時間処理

(8) 酸化剤の影響

各種プロテアーゼを50mmol/L過酸化水素を含むブリットン・ロビンソン緩衝液(pH8.0)中30℃で処理を行い、経時的に残存活性を測定した。図6に示すように、3種類の酵素は市販洗浄剤用酵素のサビナーゼやKAPを大きく上回る安定性を示し、蛋白工学的手法を用いてサビナーゼに酸化剤耐性を付与したデュラザイム(ノボ・ノルディスク社製)並の優れた安定性を示した。

(9) 脂肪酸の影響

結果を表6に示すように、本発明アルカリプロテアーゼは、皮脂の成分の一つであるオレイン酸10mMの存在下で活性を全く失わなかった。

表 4

阻 害 剤	濃度 (mM)	残 存 活 性 (%)		
		KP43	KP1790	KP9860
無添加	—	100	100	100
EDTA	5	110	97	101
EGTA	5	92	91	90
o-フェナントロリン	5	100	103	100
DTT	5	104	102	105
PCMB	1	125	115	126
NEM	5	97	100	100
DFP	1	14	17	16
PMSF	1	0	0	0
キモスタチン	0.1	87	87	80
アンチバイン	0.1	103	99	97
ロイペプチン	0.1	102	101	93
E-64	0.1	104	99	103
エラスタチナール	0.1	99	102	102

EDTA: エチレンジアミン4酢酸 (シグマ社製)

EGTA: エチレンジアミン4酢酸 (シグマ社製)

DTT: ジチオスレイトール (シグマ社製)

PCMB: p-クロロマーキュリ安息香酸 (シグマ社製)

NEM: N-エチルmaleimide (シグマ社製)

DFP: ジイソプロピルフルオルリン酸 (シグマ社製)

PMSF: フェニルメタンスルホニルフルオリド (シグマ社製)

(7) 界面活性剤の影響

各種プロテアーゼを0.1mol/Lトリス-塩酸緩衝液(pH9.0)中、1%の各種界面活性剤で40℃、4時間の処理を行い、残存活性を測定した。残

表 6

	脂肪酸存在下での相対活性 (%)				
	オレイン酸濃度 (mM)				
	0	1	2	5	10
KP43プロテアーゼ	100	100	100	103	119
KP1790プロテアーゼ	100	100	100	108	121
KP9860プロテアーゼ	100	100	100	100	106

実施例5 (KP9860プロテアーゼ遺伝子のクローニング)

(1) KSM-KP9860株ゲノムDNAの調製法

KSM-KP9860株を液体培地(0.5%グルコース、0.2%ポリペプトン-S、0.05%酵母エキス、0.1%KH₂PO₄・7H₂O、0.26%NaCO₃、pH9.0)500mLで30℃、2日間培養した後、遠心分離により菌体を回収した。得られた菌体から、SaitoとMiuraの方法(Biochim. Biophys. Acta. 72, 619 (1963))から方法によりゲノムDNAを調製した。

(2) KP9860プロテアーゼの部分分解と分解産物の回収

1) 熱失活によるKP9860プロテアーゼの変性

KP9860プロテアーゼ (5mg/mL)	45 μ L
PMSF (100mM)	20 μ L
EDTA (200mM)	10 μ L
SDS (0.08mg/mL)	25 μ L

上記の組成のプロテアーゼ溶液を沸騰水中で10分間加熱した。プロテアーゼ溶液を2mM酢酸アンモニウムで透析し、SDS、EDTA、PMSFを除いた後、凍結乾燥した後、100 μ Lの蒸留水に溶解し、変性蛋白サンプルとした。

2) トリプシンによる部分分解

変性蛋白サンプル	100 μ L
トリプシン (1 μ g/mL, Sigma)	100 μ L
1M Tris-HCl (pH7.5)	50 μ L

蒸留水

750 μ L

トリプシンを1)で得られた変性蛋白サンプルに対して、上記の組成で水中で3時間作用させた。反応の停止はSDS (0.08 mg/mL)、EDTA (2.00 mM)、PMSF (100 mM)をそれぞれ300 μ L、100 μ L、20 μ L加え、沸騰水中で3分間加熱することで行った。

2 mM 酢酸アンモニウムで透析し、SDS、EDTA、PMSFを除いた後、凍結乾燥した後、100 μ Lの蒸留水に溶解し、SDS-PAGE用のサンプルとした。

3) 部分分解物の回収

2)で得られたサンプルをレディゲル-J (Bio-Rad社製) 12%で電気泳動し、Quick CBB染色液 (Bio-Rad社製) で染色し蛋白バンドを検出した。蛋白バンド部分を剃刀で切り出し、1.5 mLチューブ内で凍結後、5倍量のSDS-PAGE泳動バッファー (組成はグリシン14.4% (W/V)、Trisは3.03%、SDS (Bio-Rad社製) 10%)を加え、室温で攪拌し蛋白バンドを溶出させた。得られた溶出液を2 mM 酢酸アンモニウムで透析、凍結乾燥して、プロテインシーケンサー (Protein Sequencer 476A型: Applied Biosystem社製)を用いた解析に供した。

得られた部分分解物のN末端配列を図7に示す。

(3) PCR

増幅すべきDNA領域のそれぞれの+鎖、-鎖の5'末端に相当する20~30塩基長のプライマー (図8)を合成し、鋳型DNA 100 ng、プライマー 20 pmolを用いてPwo DNA polymerase (Boehringer mannheim社製)を用いて100 μ Lの反応系でPCR反応を行った。また、インバースPCRを行う場合はExpandTM long template PCR system (Boehringer mannheim社製)を用いて50 μ Lの反応系で行った。図8に示したプライマーである9860-N2と9860-25k-RVを用いたPCRにより、527 bpのDNA断片を取得した。

KP9860染色体をEcoR I、Sac I、Kpn I、Hind I II、BamH I、Xho I、Pst I、Bgl I Iを用いて処理し、得られた527 bp DNAをプローブにサザンハイブリダイゼーションを行い、相同性領域の検出を試みた。

その結果、Kpn Iを除く各々のレーンでハイブリダイズするバンドが認められた。

(7) インバースPCR

得られた527 bpの配列から作製したプローブ1~4 (図9)を用いてインバースPCRを行った。KP-9860染色体を制限酵素EcoRI、Hind III、Pst I、Bgl I Iによる完全消化を行い、各々Ligation Kit ver. 2 (Takara社製) 処理をキットに従って行った。得られた反応液をエタノール沈殿させ、インバースPCR用鋳型DNAとした。EcoRI、Hind III、Pst I、Bgl I I制限酵素処理インバースPCR用鋳型DNA 0.1 μ g、プライマー1及び4各10 pmolとExpand long template PCR systemを用いて、PCR反応 (条件: (94℃ 10秒、60℃ 30秒、68℃ 4分) 10サイクル、(94℃ 10秒、60℃ 30秒、68℃ 4分+20×サイクル数) 20サイクル、68℃ 7分、4℃ 1分)を行った。又、EcoRI制限酵素処理インバースPCR用鋳型DNA 0.1 μ g、プライマー2及び3各10 pmolとExpand long template PCR systemを用いて、PCR反応 (条件: 同上)を行った。得られた増幅DNA断片をHigh Pure PCR Product Purification Kitを用いて精製後、DNA blunting Kit (Takara社製)を用いて末端を平頭化した。得られたDNA断片と制限酵素Sma I処理したpUC18とを混合し、キットに従ってLigation Kit ver. 2処理を行った。得られた、処理反応液を用いて大腸菌JM109株をコンピテンスセル法を用いて形質転換し、組換えプラスミドを取得した。得られた組換えプラスミドに挿入されたDNA断片を上記に従ってシーケンスし、塩基配列の決定を行った。

(8) KP-9860プロテアーゼ遺伝子の全塩基配列の解析

(4) PCR産物のサブクローニング

PCR産物をHigh pure PCR product purification kit (Boehringer mannheim社製)を用いて精製した後、pUC18のSma IサイトにLigation Kit ver. 2 (Takara社製)を用いて16℃、一夜反応により挿入した。得られた組換えプラスミドとコンピテントセルE. coli JM109株 (Takara社製)を混合し、42℃、45秒間のヒートショックを与え、E. coli JM109株を形質転換した。菌液にLBを加え、37℃で1時間保温した後、IPTG (0.1 mM, Sigma)及びX-gal [0.004% (w/v), Sigma]、アンピシリン (50 μ g/mL, Sigma)を含有するLBプレートに塗布した。37℃で一晩培養し、生育したホワイトコロニーを組換えプラスミドが挿入された形質転換体として選抜した。

(5) 塩基配列の決定

形質転換体をアンピシリン50 μ g/mLを含有したLBで37℃で一晩培養し、菌体を遠心分離により回収後、High pure plasmid isolation kitを用いて (Boehringer mannheim社製) 組換えプラスミドを得た。得られた組換えプラスミド1 μ gを鋳型として、プライマーとDNA Sequencing kit (PERKIN ELMER社製)を用いて20 μ Lの反応系でPCR反応を行った。反応生成物をQuick spin column (Boehringer mannheim社製)を用いて精製した。後に、遠心エバポレーターで乾燥させ、DNA Sequencer 377型 (Applied Biosystem社製)を用いた解析に供した。

PCRによって得られたDNA断片は、KP-9860プロテアーゼのN末端配列に一致するアミノ酸配列を有し、サブチリシン等のアルカリプロテアーゼの活性中心を構成する3つのアミノ酸 (Asp, His, Ser) の内、AspとHis周辺の共通配列と考えられる配列が認められたことから、KP-9860プロテアーゼ遺伝子の一部分であると考えられた。

(6) サザンハイブリダイゼーション

シーケンスの結果、KP-9860プロテアーゼ遺伝子には1917 bp、639アミノ酸残基をコードするOpen Reading Frame (ORF)が存在し、ORF中には精製酵素のN末端配列に一致する領域が存在した (NDVARHIVKADVAQSSYGLY)。N末端配列から、成熟型プロテアーゼは1302 bp、434アミノ酸残基と推定された (配列番号3、分子量45310 Da)。またORFの上流にはプロモーター領域 (-35領域: ttgtgt, -10領域: tacgat)及びリボソーム結合部位 (SD配列: aggagt)と推定される配列が認められた。終止コドン (taa)の下流にはターミネーターと推定される、-26.2 kcal/molの自由エネルギーを有するインバーテッド・リピートが存在した。

実施例5と同様にして、KP-43プロテアーゼ及びKP-1790プロテアーゼのそれぞれの遺伝子の全塩基配列及びアミノ酸配列を解析した。その結果を配列番号4及び5に示す。

実施例6

洗浄試験:

JIS K 3371に準じ洗浄試験を行った。洗浄系は、表7記載の配合組成から成る洗剤を71.2 mg CaCO₃/L (4° DH)の水にて使用濃度に溶解後、各種のプロテアーゼをアンソール・ヘモグロビン法で40 mAPU/Lとなるようにそれぞれ添加した (表8参照)。

試験布は、ワイシャツの袖部分 (3日間着用)とし、一対比較ができるように8×8 cm程に裁断後、酵素添加、あるいは酵素無添加の洗浄系にてターゴトメーター (上島製作所製)を使用し、15℃、100 rpmで10分間洗浄を行った。産物、乾燥後、一対の袖布 (15組)を見比べ汚れ落ちの程度を肉眼で判定した。判定方法は、汚れがほぼ完全に落ちている場合を5点、汚れがほとんど落ちていない場合を1点とし、15枚の袖布の合計評価点を求め、酵素無添加の洗浄系による評価点を100とした場合の比率を洗浄力指数として表した。この結果を表8に示す。

表 7

(重量%)			
成分 (%)	洗剤A	洗剤B	洗剤C
LAS	23.0	4.0	20.0
AS	4.0		
AE	5.0		
AEP		5.0	
AES		20.0	
脂肪酸塩	3.0	2.5	2.0
ゼオライト	22.0		20.0
炭酸ナトリウム	15.0		
炭酸カリウム	3.0		
非晶質珪酸塩	7.0		7.0
結晶性珪酸塩	4.0		
亜硫酸ナトリウム	2.0	0.5	2.0
硫酸ナトリウム	2.0		23.0
AA-MA	5.0		
クエン酸			10.0
PEG	2.0		2.0
モノエタノールアミン		8.0	
エタノール		5.0	
水分	3.0	残部	7.0
形態	粒状	液状	粒状
使用濃度	20g/30L	20g/30L	40g/30L
洗剤後のpH	10.7	9.2	8.0

LAS:直鎖アルキル(C₁₂~C₁₄)ベンゼンスルホン酸ナトリウム

(液体洗剤は酸型で配合)

AS:ドデシルアルコール硫酸エステルナトリウム

AE:ポリオキシエチレンラウリルエーテル(EO平均付加モル数4)

AEP:ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンラウリルエーテル

(EO平均付加モル数8、PO平均付加モル数3)

AES:ポリオキシエチレンアルキル(C₁₂~C₁₄)エーテル硫酸ナトリウム

(EO平均付加モル数2.5)

脂肪酸:ヤシ油由来脂肪酸ナトリウム

ゼオライト:4A型ゼオライト、平均粒径3μm

炭酸ナトリウム:デンス灰

を7.1.2mgCaCO₃/L(4°DH)の水にて使用濃度に溶解後、実施例6と同様にして布を洗浄した。得られた洗剤は優れた洗浄力を有し、衣料用洗剤として有用である。

表 9

成分 (%)	本 発 明 品												
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
LAS-2	20		20.5		12					5	10		
LAS-3		15											
AS-2			5		10		20						
SAS	3												
AOS		3											
SFE		8											
脂肪酸塩	2	6	4	10	3	3	2	1.5					
AES-2								20					
AE-3	3		3	15		15	3		15	10			
AE-4							2	20	20	5			
AE-5											25		
AG												7	
ゼオライト	30	18	15	15		10	20						
吸油性担体						12							
結晶性珪酸塩				20									
非晶質珪酸塩	12	1	8		10		5						
STPP					25.5	20	17.5	0.1					
炭酸ナトリウム	10	27	25	10	10	15							
炭酸カリウム		3		2	5	1							
亜硫酸ナトリウム	2							0.2	0.2	0.2			
硫酸ナトリウム	4.5	1.5		1	11	3	10	5	1.5	1	1		
クエン酸ナトリウム			4	2									
NTA						2							
モノエタノールアミン									4	5	6		
PAA					1	1.5	3						
AA-MA													
CMC	2	3	3	5									
PEG													
PVP	5	2	2	2	2			1.5					
香料	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
水	4	5	3	0.5	6	1	5	42.7	32	30	30	30	30
エタノール								5	5	5	5	5	5
プロピレングリコール								2	2	2	2	2	2
酵素	2	2	2	3	3	2	2	0.1	0.2	0.2			
PL					10								
AE-1				2									
AE-2				1									
合計	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
形態	粒状	粒状	粒状	粒状	粒状	粒状	粒状	液状	液状	液状	液状	液状	液状
使用濃度	20g/30L	20g/30L	20g/30L	20g/30L	20g/30L	20g/30L	20g/30L	20g/30L	20g/30L	20g/30L	20g/30L	20g/30L	20g/30L

非晶質珪酸塩:JIS2号珪酸ナトリウム

結晶性珪酸塩:SKS-6(ヘキストクヤマ社製)粉砕品、

平均粒径15μm

AA-MA:ソカランCP5、アクリル酸-マレイン酸共重合体

(BASF社製)

PEG:ポリエチレングリコール、平均分子量8,000

表 8

	プロテアーゼ	洗浄力指数
		洗剤A
本発明品1	Bacillus sp. KSM-KP43(実施例2)	106
本発明品2	Bacillus sp. KSM-KP1790(実施例3)	106
本発明品3	Bacillus sp. KSM-KP980(実施例3)	105
比較品1	Savinase 12.0T type White® (ノボルディスク社製)	103.5
比較品2	Durazyme 6.0T® (ノボルディスク社製)	103.5
比較品3	なし	100

表8より、活性が同じ条件であっても、本発明品を配合した洗剤(洗剤A)は、従来のプロテアーゼ配合洗剤より優れた洗浄力を有することが分かる。本発明品の優れた洗浄効果は、同様に、洗剤B及び洗剤Cでも得られる。

実施例7

表9に示す組成の洗剤100重量部に、実施例2又は3で得られたBacillus sp. KSM-KP43、KSM-KP1790又はKSM-KP9860由来の本発明プロテアーゼ精製標品から特開昭62-257990号公報記載の方法に基づき調製した造粒物(6APU/g)を1重量部配合して本発明の洗剤組成物を調製した。なお、粒状洗剤の場合には、酵素、PC、AC-1、AC-2を除いた成分で粒子化した洗剤生地に、酵素、PC、AC-1、AC-2をそれぞれ粒子化したものをブレンドすることにより製造した。各洗剤

LSA-2:アルキルベンゼンスルホン酸(アルキル鎖の炭素数10~14)を48%NaOHで中和したもの

LAS-3:アルキルベンゼンスルホン酸(アルキル鎖の炭素数10~14)を50%KOHで中和したもの

AS-2:ドデシル2.5サルフェート(C₁₂~C₁₄硫酸)のナトリウム塩

SAS:C₁₂~C₁₄アルカンスルホン酸ナトリウム

AOS:アルファオレフィンスルホン酸ナトリウム

SFE:パーム油由来、アルファスルホ脂肪酸メチルエステルナトリウム

脂肪酸塩:パルミチン酸ナトリウム

AES-2:ポリオキシエチレンアルキル(C₁₂~C₁₄)エーテル硫酸ナトリウム(EO平均付加モル数2)

AE-3:C₁₂~C₁₄アルコールにEOを平均3モル付加したもの

AE-4:C₁₂~C₁₄アルコールにEOを平均7.2モル付加したもの

AE-5:C₁₂~C₁₄2級アルコールにEOを平均7モル付加したもの

AG:アルキル(ヤシ油由来)グルコシド(平均重合度1.5)

吸油性担体:非晶質アルミノ珪酸ソーダ、吸油性235mL/100g

結晶性珪酸塩:SKS-6(δ-Na₂Si₂O₆、結晶性層状シリケート、平均粒子径20μm)

非晶質珪酸塩:JIS1号珪酸ナトリウム

STPP:トリポリリン酸ナトリウム

NTA:ニトリトリリン酸ナトリウム

PAA:ポリアクリル酸ナトリウム、平均分子量12,000

AA-MA:アクリル酸/マレイン酸共重合体

CMC:カルボキシメチルセルロースナトリウム

PEG:ポリエチレングリコール、平均分子量6,000

PVP:ポリビニルピロリドン、平均分子量40,000、K値=26~35

香料:チノバルCBSと、ホワイテックスSAを重量比1:1で配合したもの(注意:液体洗剤の場合はチノバルCBSのみ配合)

香料:特開平8-239700号公報の実施例記載の香料組成を使用

酵素：リポラーゼ100T、ターミル60T、及びKAC500TM（花王（株）製）を重量比率で1：1：1の割合で配合したもの

PC：過炭酸ソーダ、平均粒子径400 μ m、メタホウ酸ソーダにて被覆したもの

AC-1：テトラアセチルエチレンジアミン

AC-2：ラウロイルオキシベンゼンスルホン酸ナトリウム

実施例8

表10に示す組成のうち、過炭酸ナトリウムと炭酸ナトリウム（デンス灰）を攪拌混合しながら、ポリアクリル酸ナトリウム40%水溶液及び直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム又は非イオン性界面活性剤又はラウロイルオキシベンゼンスルホン酸ナトリウムを添加した。次いで実施例7で得られた *Bacillus* sp. KSM-KP43 由来のアルカリプロテアーゼ微粒物を添加し、全体的に均一になる程度に攪拌することにより、漂白剤を調製した。次いで、各漂白剤の0.5%水溶液中に特布を20℃、30分間浸漬後、洗剤A（実施例6参照）にてターボトメーターで100rpm、10分、20℃で洗浄した。得られた漂白剤は優れた漂白力を有し、衣料用漂白剤として有用である。

表10

(重量%)

成分	本発明品			
	14	15	16	17
過炭酸ナトリウム ¹⁾	80.0	80.0	80.0	80.0
炭酸ナトリウム（デンス灰）	16.0	12.0	16.0	12.0
陰イオン性界面活性剤 ²⁾	2.0	2.0	-	-
非イオン性界面活性剤 ³⁾	-	-	2.0	2.0
ポリアクリル酸ナトリウム ⁴⁾	1.0	1.0	1.0	1.0
ラウロイルオキシベンゼンスルホン酸ナトリウム	-	4.0	-	4.0
<i>Bacillus</i> sp. KSM-KP43 アルカリプロテアーゼ（実施例7）	1.0	1.0	1.0	1.0

1) 粒径500～700 μ m

2) 直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム（炭素数12～14）

3) ポリオキシエチレンアルキルエーテル（アルキル基の炭素数12～14、EO平均付加モル数12）

4) 平均分子量8,000

実施例9

表11に示す組成の自動食器洗浄機用洗浄剤組成物を実施例8と同様にして調製した。得られた自動食器洗浄機用洗浄剤組成物について、下記条件で洗浄力試験を行った。得られた洗浄剤は優れた洗浄力を有し、自動食器洗浄機用洗浄剤として有用である。

表11

成分	本発明品			
	18	19	20	21
ブルロニックL-61 ¹⁾	4	-	4	4
ソフタノールEP-7085 ²⁾	-	4	-	-
クエン酸ナトリウム	30	30	-	-
EDTA	-	-	30	-
トリポリリン酸ナトリウム	-	-	-	30
過炭酸ナトリウム	20	20	20	20
炭酸ナトリウム（デンス灰）	20	20	20	20
非晶質珪酸塩 ³⁾	10	10	10	10
AA-MA ⁴⁾	4	4	4	4
芒硝	10	10	10	10
リポラーゼ100T Φ （ノボルディスク社製）	0.5	0.5	0.5	0.5
ターミル60T Φ （ノボルディスク社製）	1	1	1	1
<i>Bacillus</i> sp. KSM-KP43 アルカリプロテアーゼ（実施例7）	0.5	0.5	0.5	0.5

1)：ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン共重合体（平均分子量2,000）

2)：炭素数12～14のsec-アルコールのエチレンオキシド7モル、及びプロピレンオキシド6.5モル付加物

3)：JIS 2号珪酸ナトリウム

4)：アクリル酸-マレイン酸共重合体

(1) 汚染量の調製

直径2.5cmの磁器製の皿一枚当たり2.5gの卵黄を刷毛で均一に塗布し

115℃に置いた乾燥機中で60分乾燥させ、試験に供した。

(2) 洗浄条件

使用洗浄機：松下電器（株）製全自動食器洗い機（機種NP-810）

洗浄：標準コース

洗浄用水：硬度62、3mgCaCO₃/L（3.5°DH）の水

洗剤濃度：0.2重量%

(3) 評価方法

汚染皿5枚を洗浄機に入れ、上記の洗浄条件にて実施例の洗浄剤組成物を用いて洗浄を行った。洗浄後の皿を1%エリトリン溶液を用いて蛋白染色し、残留する蛋白汚染を肉眼判定した。

実施例10

表12に示す各成分を用い、自動食器洗浄機用洗浄剤組成物を得た。これらの自動食器洗浄機用洗浄剤組成物を用いて、実施例9と同様に洗浄力試験を行ったところ、いずれも優れた洗浄効果が得られた。

表 12

(重量%)

成分	本 発 明 品				
	22	23	24	25	26
(a) 炭酸ナトリウム	30		30		50
炭酸水素ナトリウム		25		25	
(b) ソカラン CP5 ¹⁾	5	6	5	5	5
(c) 過炭酸水素ナトリウム	5		6		
(d) リモネン	2	2		1	1
ソフタノール EP7045 ²⁾			2	1	1
(c) 非晶性アルミノケイ酸ナトリウム (合成例 1) ³⁾	2		2	1	3
非晶性アルミノケイ酸ナトリウム (合成例 2) ⁴⁾		2		1	
リパーゼ 160T ⁵⁾ (ノボノルディスク社製)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
ターミル 60T ⁵⁾ (ノボノルディスク社製)	1	1	1	1	1
Bacillus sp. KSM-HP43 アルカリ プロテアーゼ (実施例 7)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
リンゴ酸ナトリウム		10		5	
クエン酸ナトリウム	15		10	4	8
硫酸ナトリウム	39	53	43	55	30

1) アクリル酸/マレイン酸共重合体 BASF 社製

2) 炭素数 12~14 の sec-アルコールのエチレンオキシド 7 モル、及び
プロピレンオキシド 4、5 モル付加物

3, 4) 合成例は特開平 6-179899 号公報に記載

実施例 11

前記洗剤 A (実施例 6 参照) に下記表 13 記載の配合量にて各種酵素を添加し

、実施例 6 と同様にしてワイシャツの袖部分を洗浄した。

SEQUENCE LISTING

<110>	KAO CORPORATION
<120>	Alkaline Protease
<130>	FP-KS-0488
<150>	JP 09-274570
<151>	1997-10-07
<160>	5
<210>	1
<211>	639
<212>	PRT
<213>	Bacillus sp.
<220>	
<221>	misc_feature
<222>	23, 29, 32, 46, 47, 53, 70, 74, 89, 102, 105, 128, 136, 131, 132, 133, 146, 148, 160, 165, 172, 183, 187, 188, 189, 191, 286, 306, 324, 369, 431, 501, 531, 541, 584, 591, 592, 594, 595, 596, 611, 632
<223>	Xaa=arbitrarily amino acid
<400>	

表 13

(重量%)

酵 素	本 発 明 品						
	27	28	29	30	31	32	33
本発明品プロテアーゼ ¹⁾	-	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
従来プロテアーゼ ²⁾	-	-	0.6	-	-	0.6	0.6
セルラーゼ ³⁾	-	-	-	0.7	-	0.7	0.7
リパーゼ ⁴⁾	-	-	-	-	0.5	-	0.5

1) 実施例 2 で得られた Bacillus sp. KSM-HP43 株由来の本発明プロテアーゼ精製品から特開昭 62-257990 号公報に記載の方法に基づき調製した造粒物 (6 APU/g)

2) 特開平 5-25492 号公報に記載のプロテアーゼ K-16 を特開昭 62-257990 号公報に記載の方法に基づき、5 APU/g としたもの

3) KAC-500⁵⁾ (セルラーゼ、500 U/g、花王製)4) Lipolase 100T⁵⁾ (ノボノルディスク社製)

その結果、本発明プロテアーゼと従来プロテアーゼ、セルラーゼ、又はリパーゼとを組合わせて用いると洗浄効果がより向上する。

産業上の利用可能性

本発明のアルカリプロテアーゼは、各種の界面活性剤に極めて安定であり、脂肪耐性を有し、かつ酸化剤にも高い安定性を有することから、漂白剤成分を含む食器洗浄機用洗剤及び衣料用洗浄剤用の酵素として有用である。

【配列表】

Met	Arg	Lys	Lys	Lys	Val	Phe	Leu	Ser	Val	Leu	Ser	Ala	Ala	Ala	Ile
1			5						10					15	
Leu	Ser	Thr	Val	Ala	Leu	Xaa	Asn	Pro	Ser	Ala	Gly	Xaa	Ala	Arg	Xaa
			20						25					30	
Phe	Asp	Leu	Asp	Phe	Lys	Gly	Ile	Gln	Thr	Thr	Thr	Asp	Xaa	Xaa	Gly
			35						40					45	
Phe	Ser	Lys	Gln	Xaa	Gln	Thr	Gly	Ala	Ala	Ala	Phe	Leu	Val	Glu	Ser
			50						55					60	
Glu	Asn	Val	Lys	Leu	Xaa	Lys	Gly	Leu	Xaa	Lys	Lys	Leu	Glu	Thr	Val
			65						70					75	
Pro	Ala	Asn	Asn	Lys	Leu	His	Ile	Xaa	Gln	Phe	Asn	Gly	Pro	Ile	Leu
			85						90					95	
Glu	Glu	Thr	Lys	Gln	Xaa	Leu	Glu	Xaa	Thr	Gly	Ala	Lys	Ile	Leu	Asp
			100						105					110	
Tyr	Ile	Pro	Asp	Tyr	Ala	Tyr	Ile	Val	Glu	Tyr	Glu	Gly	Asp	Val	Xaa
			115						120					125	
Ser	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Ile	Glu	His	Val	Glu	Ser	Val	Glu	Pro	Tyr	Leu
			130						135					140	
Pro	Xaa	Tyr	Xaa	Ile	Asp	Pro	Gln	Leu	Phe	Thr	Lys	Gly	Ala	Ser	Xaa
			145						150					155	
Leu	Val	Lys	Ala	Xaa	Ala	Leu	Asp	Thr	Lys	Gln	Xaa	Asn	Lys	Glu	Val
			165						170					175	
Gln	Leu	Arg	Gly	Ile	Glu	Xaa	Ile	Ala	Gln	Xaa	Xaa	Xaa	Ser	Asn	Asp
			180						185					190	
Val	Xaa	Tyr	Ile	Thr	Ala	Lys	Pro	Glu	Tyr	Lys	Val	Met	Asn	Asp	Val
			195						200					205	

(38)

WO 99/18218

Ala Arg Gly Ile Val Lys Ala Asp Val Ala Glu Ser Ser Tyr Gly Leu
 210 215 220
 Tyr Gly Gln Gly Gln Ile Val Ala Val Ala Asp Thr Gly Leu Asp Thr
 225 230 235 240
 Gly Arg Asn Asp Ser Ser Met His Glu Ala Phe Arg Gly Lys Ile Thr
 245 250 255
 Ala Leu Tyr Ala Leu Gly Arg Thr Asn Asn Ala Asn Asp Thr Asn Gly
 260 265 270
 His Gly Thr His Val Ala Gly Ser Val Leu Gly Asn Gly Xaa Thr Asn
 275 280 285
 Lys Gly Met Ala Pro Gln Ala Asn Leu Val Phe Gln Ser Ile Met Asp
 290 295 300
 Ser Xaa Gly Gly Leu Gly Gly Leu Pro Ser Asn Leu Gln Thr Leu Phe
 305 310 315 320
 Ser Gln Ala Xaa Ser Ala Gly Ala Arg Ile His Thr Asn Ser Trp Gly
 325 330 335
 Ala Ala Val Asn Gly Ala Tyr Thr Thr Asp Ser Arg Asn Val Asp Asp
 340 345 350
 Tyr Val Arg Lys Asn Asp Met Thr Ile Leu Phe Ala Ala Gly Asn Glu
 355 360 365
 Xaa Pro Asn Gly Gly Thr Ile Ser Ala Pro Gly Thr Ala Lys Asn Ala
 370 375 380
 Ile Thr Val Gly Ala Thr Glu Asn Leu Arg Pro Ser Phe Gly Ser Tyr
 385 390 395 400
 Ala Asp Asn Ile Asn His Val Ala Gln Phe Ser Ser Arg Gly Pro Thr
 405 410 415

(40)

WO 99/18218

Asn Val Pro Val Gly Pro Gln Xaa Phe Ser Leu Ala Ile Val Asn
 625 630 635
 <210> 2
 <211> 640
 <212> PRT
 <213> *Bacillus sp.*
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 3, 24, 30, 33, 47, 48, 54, 71, 75, 90, 103, 106, 129, 131, 132, 133, 134, 147,
 149, 161, 166, 173, 184, 188, 189, 190, 195, 287, 307, 325, 370, 432, 502,
 532, 542, 585, 592, 593, 595, 596, 597, 612, 633
 <223> Xaa=arbitrary amino acid
 <400>
 Met Arg Xaa Lys Lys Lys Val Phe Leu Ser Val Leu Ser Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 Ile Leu Ser Thr Val Ala Leu Xaa Asn Pro Ser Ala Gly Xaa Ala Arg
 20 25 30
 Xaa Phe Asp Leu Asp Phe Lys Gly Ile Gln Thr Thr Thr Asp Xaa Xaa
 35 40 45
 Gly Phe Ser Lys Gln Xaa Gln Thr Gly Ala Ala Ala Phe Leu Val Glu
 50 55 60
 Ser Glu Asn Val Lys Leu Xaa Lys Gly Leu Xaa Lys Lys Leu Glu Thr
 65 70 75 80
 Val Pro Ala Asn Asn Lys Leu His Ile Xaa Gln Phe Asn Gly Pro Ile

(39)

WO 99/18218

Lys Asp Gly Arg Ile Lys Pro Asp Val Met Ala Pro Gly Thr Xaa Ile
 420 425 430
 Leu Ser Ala Arg Ser Ser Leu Ala Pro Asp Ser Ser Phe Trp Ala Asn
 435 440 445
 His Asp Ser Lys Tyr Ala Tyr Met Gly Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro
 450 455 460
 Ile Val Ala Gly Asn Val Ala Gln Leu Arg Glu His Phe Val Lys Asn
 465 470 475 480
 Arg Gly Ile Thr Pro Lys Pro Ser Leu Leu Lys Ala Ala Leu Ile Ala
 485 490 495
 Gly Ala Ala Asp Xaa Gly Leu Gly Tyr Pro Asn Gly Asn Gln Gly Trp
 500 505 510
 Gly Arg Val Thr Leu Asp Lys Ser Leu Asn Val Ala Tyr Val Asn Glu
 515 520 525
 Ser Ser Xaa Leu Ser Thr Ser Gln Lys Ala Thr Tyr Xaa Phe Thr Ala
 530 535 540
 Thr Ala Gly Lys Pro Leu Lys Ile Ser Leu Val Trp Ser Asp Ala Pro
 545 550 555 560
 Ala Ser Thr Thr Ala Ser Val Thr Leu Val Asn Asp Leu Asp Leu Val
 565 570 575
 Ile Thr Ala Pro Asn Gly Thr Xaa Tyr Val Gly Asn Asp Phe Xaa Xaa
 580 585 590
 Pro Xaa Xaa Xaa Asn Trp Asp Gly Arg Asn Asn Val Glu Asn Val Phe
 595 600 605
 Ile Asn Xaa Pro Gln Ser Gly Thr Tyr Thr Ile Glu Val Gln Ala Tyr
 610 615 620

(41)

WO 99/18218

85 90 95
 Leu Glu Glu Thr Lys Gln Xaa Leu Glu Xaa Thr Gly Ala Lys Ile Leu
 100 105 110
 Asp Tyr Ile Pro Asp Tyr Ala Tyr Ile Val Glu Tyr Glu Gly Asp Val
 115 120 125
 Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Ile Glu His Val Glu Ser Val Glu Pro Tyr
 130 135 140
 Leu Pro Xaa Tyr Xaa Ile Asp Pro Gln Leu Phe Thr Lys Gly Ala Ser
 145 150 155 160
 Xaa Leu Val Lys Ala Xaa Ala Leu Asp Thr Lys Gln Xaa Asn Lys Glu
 165 170 175
 Val Gln Leu Arg Gly Ile Glu Xaa Ile Ala Gln Xaa Xaa Xaa Ser Asn
 180 185 190
 Asp Val Xaa Tyr Ile Thr Ala Lys Pro Glu Tyr Lys Val Met Asn Asp
 195 200 205
 Val Ala Arg Gly Ile Val Lys Ala Asp Val Ala Gln Ser Ser Tyr Gly
 210 215 220
 Leu Tyr Gly Gln Gly Gln Ile Val Ala Val Ala Asp Thr Gly Leu Asp
 225 230 235 240
 Thr Gly Arg Asn Asp Ser Ser Met His Glu Ala Phe Arg Gly Lys Ile
 245 250 255
 Thr Ala Leu Tyr Ala Leu Gly Arg Thr Asn Asn Ala Asn Asp Thr Asn
 260 265 270
 Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Ser Val Leu Gly Asn Gly Xaa Thr
 275 280 285
 Asn Lys Gly Met Ala Pro Gln Ala Asn Leu Val Phe Gln Ser Ile Met

(42) WO 99/18218

290 295 300
 Asp Ser Xaa Gly Gly Leu Gly Gly Leu Pro Ser Asn Leu Gln Thr Leu
 305 310 315 320
 Phe Ser Gln Ala Xaa Ser Ala Gly Ala Arg Ile His Thr Asn Ser Trp
 325 330 335
 Gly Ala Ala Val Asn Gly Ala Tyr Thr Thr Asp Ser Arg Asn Val Asp
 340 345 350
 Asp Tyr Val Arg Lys Asn Asp Met Thr Ile Leu Phe Ala Ala Gly Asn
 355 360 365
 Glu Xaa Pro Asn Gly Gly Thr Ile Ser Ala Pro Gly Thr Ala Lys Asn
 370 375 380
 Ala Ile Thr Val Gly Ala Thr Glu Asn Leu Arg Pro Ser Phe Gly Ser
 385 390 395 400
 Tyr Ala Asp Asn Ile Asn His Val Ala Gln Phe Ser Ser Arg Gly Pro
 405 410 415
 Thr Lys Asp Gly Arg Ile Lys Pro Asp Val Met Ala Pro Gly Thr Xaa
 420 425 430
 Ile Leu Ser Ala Arg Ser Ser Leu Ala Pro Asp Ser Ser Phe Trp Ala
 435 440 445
 Asn His Asp Ser Lys Tyr Ala Tyr Met Gly Gly Thr Ser Met Ala Thr
 450 455 460
 Pro Ile Val Ala Gly Asn Val Ala Gln Leu Arg Glu His Phe Val Lys
 465 470 475 480
 Asn Arg Gly Ile Thr Pro Lys Pro Ser Leu Leu Lys Ala Ala Leu Ile
 485 490 495
 Ala Gly Ala Ala Asp Xaa Gly Leu Gly Tyr Pro Asn Gly Asn Gln Gly

(44) WO 99/18218

1 5 10 15
 ctg tgc act gtt gca tta aac aat ccc tgc gct ggt gat gca agc act 96
 Leu Ser Thr Val Ala Leu Asn Asn Pro Ser Ala Gly Asp Ala Arg Thr
 20 25 30
 ttt gat ctg gat ttt aaa gga att caa aca aca acc gat gtc agt ggt 144
 Phe Asp Leu Asp Phe Lys Gly Ile Gln Thr Thr Thr Asp Val Ser Gly
 35 40 45
 ttc tcc aaa cag cga caa aca ggt ggc gct gca ttt ctg gtg gag tct 192
 Phe Ser Lys Gln Arg Gln Thr Gly Ala Ala Ala Phe Leu Val Glu Ser
 50 55 60
 gaa aat gtg aaa ctt ctt aaa gga ttg cta aag aaa ctt gaa aca gta 240
 Glu Asn Val Lys Leu Leu Lys Gly Leu Leu Lys Lys Leu Glu Thr Val
 65 70 75 80
 ccg gca aat aat aaa ctc cat att gtc caa ttc aat ggc ccc att tta 288
 Pro Ala Asn Asn Lys Leu His Ile Val Gln Phe Asn Gly Pro Ile Leu
 85 90 95
 gaa gaa aca aaa cag aag cta gag aca act gga gca aag att ctc gac 336
 Glu Glu Thr Lys Gln Lys Leu Glu Thr Thr Gly Ala Lys Ile Leu Asp
 100 105 110
 tac atc cct gat tat gca tat att gtc gag tat gag ggg gat gtt cag 384
 Tyr Ile Pro Asp Tyr Ala Tyr Ile Val Glu Tyr Glu Gly Asp Val Gln
 115 120 125
 tca aaa gtc cgc tcc att gaa cac gtc gaa tca gtc gag cca tac ttg 432
 Ser Lys Val Arg Ser Ile Glu His Val Glu Ser Val Glu Pro Tyr Leu
 130 135 140
 ccg aaa tac aaa ata gat ccc cag ctt ttc aca aaa ggc gca tgc acg 480

(43) WO 99/18218

500 505 510
 Trp Gly Arg Val Thr Leu Asp Lys Ser Leu Asn Val Ala Tyr Val Asn
 515 520 525
 Glu Ser Ser Xaa Leu Ser Thr Ser Gln Lys Ala Thr Tyr Xaa Phe Thr
 530 535 540
 Ala Thr Ala Gly Lys Pro Leu Lys Ile Ser Leu Val Trp Ser Asp Ala
 545 550 555 560
 Pro Ala Ser Thr Thr Ala Ser Val Thr Leu Val Asn Asp Leu Asp Leu
 565 570 575
 Val Ile Thr Ala Pro Asn Gly Thr Xaa Tyr Val Gly Asn Asp Phe Xaa
 580 585 590
 Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Asn Trp Asp Gly Arg Asn Asn Val Glu Asn Val
 595 600 605
 Phe Ile Asn Xaa Pro Gln Ser Gly Thr Tyr Thr Ile Glu Val Gln Ala
 610 615 620
 Tyr Asn Val Pro Val Gly Pro Gln Xaa Phe Ser Leu Ala Ile Val Asn
 625 630 635 640
 <210> 3
 <211> 1920
 <212> DNA
 <213> *Bacillus sp.*
 <400>
 atg aga aag aag aag gtc ttt tta tct gtt tta tca gct gca gcg att 48
 Met Arg Lys Lys Lys Val Phe Leu Ser Val Leu Ser Ala Ala Ala Ile

(45) WO 99/18218

Pro Lys Tyr Lys Ile Asp Pro Gln Leu Phe Thr Lys Gly Ala Ser Thr
 145 150 155 160
 ctg gtc aaa gcg ttg gcg ctt gat acg aag cag aac aat aaa gaa gtc 528
 Leu Val Lys Ala Leu Ala Leu Asp Thr Lys Gln Asn Asn Lys Glu Val
 165 170 175
 caa tta aga gcc atc gag gaa atc gct cag tac gta gca gcc aat gac 576
 Gln Leu Arg Gly Ile Glu Glu Ile Ala Gln Tyr Val Ala Ser Asn Asp
 180 185 190
 gtc cat tat att acg gca aag cct gaa tat aag gtc atg aat gat gtc 624
 Val His Tyr Ile Thr Ala Lys Pro Glu Tyr Lys Val Met Asn Asp Val
 195 200 205
 gcc aga ggt att gtc aaa gcg gat gtc gca cag agc agc tac ggt ttg 672
 Ala Arg Gly Ile Val Lys Ala Asp Val Ala Gln Ser Ser Tyr Gly Leu
 210 215 220
 tat gga caa gcc cag att gtc gca gtt gcc gat act gga ttg gat aca 720
 Tyr Gly Gln Gly Gln Ile Val Ala Val Ala Asp Thr Gly Leu Asp Thr
 225 230 235 240
 gga aga aac gac agt tgc alg cat gaa gcc ttc cgc ggt aaa ata aca 768
 Gly Arg Asn Asp Ser Ser Met His Glu Ala Phe Arg Gly Lys Ile Thr
 245 250 255
 gca cta tat gca ctg ggt cag acg aat aat gcg aat gat acc aac ggt 816
 Ala Leu Tyr Ala Leu Gly Arg Thr Asn Asn Ala Asn Asp Thr Asn Gly
 260 265 270
 cal ggt acc cat gtc gca ggt tgc gta tta gga aat ggc gca acg aat 864
 His Gly Thr His Val Ala Gly Ser Val Leu Gly Asn Gly Ala Thr Asn
 275 280 285

(46) WO 99/18218

aaa gga aig gca cct caa ggc aat cig gti tti caa tcc atc atg gat 912
 Lys Gly Met Ala Pro Gln Ala Asn Leu Val Phe Gln Ser Ile Met Asp
 290 295 300
 agc agt ggt ggg ctt gga ggc tlg cct tcc aat cig caa acc tta ttc 960
 Ser Ser Gly Gly Leu Gly Gly Leu Pro Ser Asn Leu Gln Thr Leu Phe
 305 310 315 320
 agc caa gca ttc agt gca ggt gcc aga att cat aca aac tcc tgg ggg 1008
 Ser Gln Ala Phe Ser Ala Gly Ala Arg Ile His Thr Asn Ser Trp Gly
 325 330 335
 gca ggc gtc aat ggg gcc tac acg aca gat tcc aga aat gtc gat gac 1056
 Ala Ala Val Asn Gly Ala Tyr Thr Thr Asp Ser Arg Asn Val Asp Asp
 340 345 350
 tat gta ggg aaa aat gat atg acg att ctt ttc ggc gct ggg aat gaa 1104
 Tyr Val Arg Lys Asn Asp Met Thr Ile Leu Phe Ala Ala Gly Asn Gln
 355 360 365
 agc cgc aac ggc ggt acc atc agt gca cct ggt acg gct aaa aac gcc 1152
 Arg Pro Asn Gly Gly Thr Ile Ser Ala Pro Gly Thr Ala Lys Asn Ala
 370 375 380
 ala aca gtc ggc gca acc gaa aac ctc cgt cca agc ttc ggt tcc tat 1200
 Ile Thr Val Gly Ala Thr Gln Asn Leu Arg Pro Ser Phe Gly Ser Tyr
 385 390 395 400
 gca gat aat att aac cac gtt gca cag ttc tct tcc cgt ggc cgc aca 1248
 Ala Asp Asn Ile Asn His Val Ala Gln Phe Ser Ser Arg Gly Pro Thr
 405 410 415
 aaa gat ggg cga atc aag cct gat gtc atg ggc cca ggg aca tac att 1296
 Lys Asp Gly Arg Ile Lys Pro Asp Val Met Ala Pro Gly Thr Tyr Ile

(48) WO 99/18218

Ala Ser Thr Thr Ala Ser Val Thr Leu Val Asn Asp Leu Asp Leu Val
 565 570 575
 att aca gca cca aac gga aca aga tat gtc ggg aat gac ttc tca gca 1776
 Ile Thr Ala Pro Asn Gly Thr Arg Tyr Val Gly Asn Asp Phe Ser Ala
 580 585 590
 cca ttt gac aat aac tgg gat ggc cgc aat aac gta gaa aat gta ttt 1824
 Pro Phe Asp Asn Asn Trp Asp Gly Arg Asn Asn Val Gln Asn Val Phe
 595 600 605
 att aat tgc ccc caa agt gga aca tat acc att gag gtc caa gca tat 1872
 Ile Asn Ser Pro Gln Ser Gly Thr Tyr Thr Ile Gln Val Gln Ala Tyr
 610 615 620
 aat gtc cgc gti gga cca caa aac ttc tgc tlg gca att gtc aac taa 1920
 Asn Val Pro Val Gly Pro Gln Asn Phe Ser Leu Ala Ile Val Asn
 625 630 635

<210> 4
 <211> 1923
 <212> DNA
 <213> *Bacillus* sp.

<400>

atg aga aag aag aaa aag gtc ttt tta tct gtt tta tca gct gca ggc 48
 Met Arg Lys Lys Lys Val Phe Leu Ser Val Leu Ser Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 att tlg tgc act gti ggc tta agt aat cca tct gca ggt ggt gca ggg 96
 Ile Leu Ser Thr Val Ala Leu Ser Asn Pro Ser Ala Gly Gly Ala Arg

(47) WO 99/18218

420 425 430
 tta tca gca aga tct tct ctt gca ccc gat tcc tcc ttc tgg ggc aat 1344
 Leu Ser Ala Arg Ser Ser Leu Ala Pro Asp Ser Ser Phe Trp Ala Asn
 435 440 445
 cat gac agc aaa tat gcc tat atg ggt gga acg tcc atg gca aca cgc 1392
 His Asp Ser Lys Tyr Ala Tyr Met Gly Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro
 450 455 460
 att gtt ggc ggg aat gtt gca cag ctc cgt gag cat ttt gtc aaa aat 1440
 Ile Val Ala Gly Asn Val Ala Gln Leu Arg Gln His Phe Val Lys Asn
 465 470 475 480
 aga gga atc act cct aag cct tcc cta tlg aaa gca gct tlg att gca 1488
 Arg Gly Ile Thr Pro Lys Pro Ser Leu Leu Lys Ala Ala Leu Ile Ala
 485 490 495
 ggt gct gct gat gtt gga tlg ggt tat cgc aac gga aac caa gga tgg 1536
 Gly Ala Ala Asp Val Gly Leu Gly Tyr Pro Asn Gly Asn Gln Gly Trp
 500 505 510
 ggc cga gtc acc ctc gat aaa tgc tlg aac gtt gcc tat gtc aac gaa 1584
 Gly Arg Val Thr Leu Asp Lys Ser Leu Asn Val Ala Tyr Val Asn Gln
 515 520 525
 tcc agt gcc cta tca act agc caa aaa ggc aca tat acc ttt act gca 1632
 Ser Ser Ala Leu Ser Thr Ser Gln Lys Ala Thr Tyr Thr Phe Thr Ala
 530 535 540
 acg ggc ggc aag cca tlg aaa atc tcc ctc gta tgg tgc gat gcc cct 1680
 Thr Ala Gly Lys Pro Leu Lys Ile Ser Leu Val Trp Ser Asp Ala Pro
 545 550 555 560
 gca agc act act gct tct gta acc ctc gtc aat gat tlg gat tlg gtc 1728

(49) WO 99/18218

20 25 30
 aat ttt gat ctc gat ttc aaa gga att cag aca aca act gat gct aaa 144
 Asn Phe Asp Leu Asp Phe Lys Gly Ile Gln Thr Thr Thr Asp Ala Lys
 35 40 45
 ggt ttc tcc aag cag ggg cag act ggt gct gct gct ttt ctc gtc gaa 192
 Gly Phe Ser Lys Gln Gly Gln Thr Gly Ala Ala Ala Phe Leu Val Gln
 50 55 60
 tct gaa aat gtc aaa ctc cca aaa ggt tlg cag aag aag ctt gaa aca 240
 Ser Gln Asn Val Lys Leu Pro Lys Gly Leu Gln Lys Lys Leu Gln Thr
 65 70 75 80
 gtc cgc gca aat aat aaa ctc cat att atc caa ttc aat gga cca att 288
 Val Pro Ala Asn Asn Lys Leu His Ile Ile Gln Phe Asn Gly Pro Ile
 85 90 95
 tta gaa gaa aca aaa cag cag ctc gaa aaa aca ggc gca aag att ctc 336
 Leu Gln Gln Thr Lys Gln Gln Leu Gln Lys Thr Gly Ala Lys Ile Leu
 100 105 110
 gac tac ata cct gat tat gct tac att gtc gag tat ggc ggc gat gti 384
 Asp Tyr Ile Pro Asp Tyr Ala Tyr Ile Val Gln Tyr Gln Gly Asp Val
 115 120 125
 aag tca gca aca acc acc att gag cac gtc gaa tcc gtc gag cct tat 432
 Lys Ser Ala Thr Ser Thr Ile Gln His Val Gln Ser Val Gln Pro Tyr
 130 135 140
 tlg cgc ala tac aga ala gat ccc cag ctt ttc aca aaa ggc gca tca 480
 Leu Pro Ile Tyr Arg Ile Asp Pro Gln Leu Phe Thr Lys Gly Ala Ser
 145 150 155 160
 gag ctt gta aaa gca gtc ggc ctt gat aca aag cag aaa aat aaa gag 528

(50)

WO 99/18218

Glu Leu Val Lys Ala Val Ala Leu Asp Thr Lys Gln Lys Asn Lys Glu
 165 170 175
 gtc caa tta aga ggc atc gaa caa atc gca caa ttc gca ata agc aat 576
 Val Gln Leu Arg Gly Ile Glu Gln Ile Ala Gln Phe Ala Ile Ser Asn
 180 185 190
 gat gtc cta tat att acg gca aag cct gag tat aag gtc atg aat gat 621
 Asp Val Leu Tyr Ile Thr Ala Lys Pro Glu Tyr Lys Val Met Asn Asp
 195 200 205
 gtt gcg cgt gga att gtc aaa gcg gat gtc gct cag agc agc tac ggc 672
 Val Ala Arg Gly Ile Val Lys Ala Asp Val Ala Gln Ser Ser Tyr Gly
 210 215 220
 ttg tat gga caa gga cag atc gta gcg gtt gcc gat aca ggc ctt gat 721
 Leu Tyr Gly Gln Gly Gln Ile Val Ala Val Ala Asp Thr Gly Leu Asp
 225 230 235 240
 aca ggt cgc aat gac agt tgc atg cat gaa gcc ttc cgc ggc aaa att 768
 Thr Gly Arg Asn Asp Ser Ser Met His Glu Ala Phe Arg Gly Lys Ile
 245 250 255
 act gca tta tat gca ttg gga cgg acg aat aat gcc aat gat acg aat 816
 Thr Ala Leu Tyr Ala Leu Gly Arg Thr Asn Asn Ala Asn Asp Thr Asn
 260 265 270
 ggt cat ggt acg cat gtc gct ggc tcc gta tta gga aac ggc tcc act 864
 Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Ser Val Leu Gly Asn Gly Ser Thr
 275 280 285
 aat aaa gga atg gcg cct cag gcg aat cta gtc ttc caa tct atc atg 912
 Asn Lys Gly Met Ala Pro Gln Ala Asn Leu Val Phe Gln Ser Ile Met
 290 295 300

(52)

WO 99/18218

435 440 445
 aac cat gac agt aat tat gca tac atg ggt gga acg tcc atg gct aca 1392
 Asn His Asp Ser Lys Tyr Ala Tyr Met Gly Gly Thr Ser Met Ala Thr
 450 455 460
 ccg atc gtt gct gga aac gtc gca cag ctt cgt gag cat ttt gtc aaa 1440
 Pro Ile Val Ala Gly Asn Val Ala Gln Leu Arg Glu His Phe Val Lys
 465 470 475 480
 aac aga ggc atc aca cca aag cct tct cta tta aaa gcg gca ctg att 1488
 Asn Arg Gly Ile Thr Pro Lys Pro Ser Leu Leu Lys Ala Ala Leu Ile
 485 490 495
 gcc ggt gca gct gac atc ggc ctt ggc tac ccg aac ggt aac caa gga 1536
 Ala Gly Ala Ala Asp Ile Gly Leu Gly Tyr Pro Asn Gly Asn Gln Gly
 500 505 510
 tgg gga cga gtc aca ttg gat aaa tcc ctg aac gtt gcc tat gtc aac 1584
 Trp Gly Arg Val Thr Leu Asp Lys Ser Leu Asn Val Ala Tyr Val Asn
 515 520 525
 gag ttc agt tct cta tcc acc agc caa aaa gcg acg tac tgc ttt act 1632
 Glu Ser Ser Ser Leu Ser Thr Ser Gln Lys Ala Thr Tyr Ser Phe Thr
 530 535 540
 gct act gcc ggc aag cct ttg aaa atc tcc ctg gta tgg tct gat gcc 1680
 Ala Thr Ala Gly Lys Pro Leu Lys Ile Ser Leu Val Trp Ser Asp Ala
 545 550 555 560
 cct gcg agc aca act gct tcc gta acg ctt gtc aat gat ctg gac ctt 1728
 Pro Ala Ser Thr Thr Ala Ser Val Thr Leu Val Asn Asp Leu Asp Leu
 565 570 575
 gtc att acc gct cca aat ggc aca cag tat gta gga aat gac ttt act 1776

(51)

WO 99/18218

gat agc ggt ggc gga ctt gga gga cta cct tgc aat ctg caa acc tta 960
 Asp Ser Gly Gly Gly Leu Gly Gly Leu Pro Ser Asn Leu Gln Thr Leu
 305 310 315 320
 ttc agc caa gca tac agt gct ggt gcr aga att cat aca aac tcc tgg 1008
 Phe Ser Gln Ala Tyr Ser Ala Gly Ala Arg Ile His Thr Asn Ser Trp
 325 330 335
 gga gca gca gtc aat ggc gct tac aca aca gat tcc aga aat gtc gat 1056
 Gly Ala Ala Val Asn Gly Ala Tyr Thr Thr Asp Ser Arg Asn Val Asp
 340 345 350
 gac tat gtc cgc aaa aat gat atg acg atc ctt ttc gct gcc ggc aat 1104
 Asp Tyr Val Arg Lys Asn Asp Met Thr Ile Leu Phe Ala Ala Gly Asn
 355 360 365
 gaa gga ccg aac ggc gga acc atc agt gca cca ggc aca gct aaa aat 1152
 Glu Gly Pro Asn Gly Gly Thr Ile Ser Ala Pro Gly Thr Ala Lys Asn
 370 375 380
 gca ala aca gtc gga gct acg gaa aac ctg cgc cca agc ttt ggc tct 1200
 Ala Ile Thr Val Gly Ala Thr Glu Asn Leu Arg Pro Ser Phe Gly Ser
 385 390 395 400
 tat gcg gac aat atc aac cat gtc gca cag ttc tct tca cgt gga ccg 1248
 Tyr Ala Asp Asn Ile Asn His Val Ala Gln Phe Ser Ser Arg Gly Pro
 405 410 415
 aca aag gat gga ccg atc aaa ccg gat gtc atg gca ccg gga acg ttc 1296
 Thr Lys Asp Gly Arg Ile Lys Pro Asp Val Met Ala Pro Gly Thr Phe
 420 425 430
 ata cta tca gca aga tct tct ctt gca ccg gat tcc tcc ttc tgg gcg 1344
 Ile Leu Ser Ala Arg Ser Ser Leu Ala Pro Asp Ser Ser Phe Trp Ala

(53)

WO 99/18218

Val Ile Thr Ala Pro Asn Gly Thr Gln Tyr Val Gly Asn Asp Phe Thr
 580 585 590
 tgc cca tac aat gat aac tgg gat ggc cgc aat aac gta gaa aat gta 1824
 Ser Pro Tyr Asn Asp Asn Trp Asp Gly Arg Asn Asn Val Glu Asn Val
 595 600 605
 ttt att aat gca cca caa agc ggc acg tat aca att gag gta cag gct 1872
 Phe Ile Asn Ala Pro Gln Ser Gly Thr Tyr Thr Ile Glu Val Gln Ala
 610 615 620
 tat aac gta ccg gtt gga cca cag acc ttc tgc ttg gca att gtc aat 1920
 Tyr Asn Val Pro Val Gly Pro Gln Thr Phe Ser Leu Ala Ile Val Asn
 625 630 635 640
 taa 1923

<210> 5

<211> 1923

<212> DNA

<212> *Bacillus* sp.

<400>

atg aga aag aag aaa aag gtc ttt tta tct gtt tta tca gct gca gcg 48
 Met Arg Lys Lys Lys Lys Val Phe Leu Ser Val Leu Ser Ala Ala Ala
 5 10 15
 att ttg tgc act gtt gcg tta agt aat cca tct gca ggt ggt gca agg 96
 Ile Leu Ser Thr Val Ala Leu Ser Asn Pro Ser Ala Gly Gly Ala Arg
 20 25 30
 aat ttt gat ctg gat ttc aaa gga att cag aca aca act gat gct aaa 144

(54) WO 99/18218

Asn Phe Asp Leu Asp Phe Lys Gly Ile Gln Thr Thr Thr Asp Ala Lys
 35 40 45
 ggt ttc tcc aag cag ggg cag act ggt gct gct gct ttt ctg gtg gaa 192
 Gly Phe Ser Lys Gln Gly Gln Thr Gly Ala Ala Ala Phe Leu Val Glu
 50 55 60
 tct gaa aat gtc aac ctc cca aaa ggt ttr cag aag aag ctt gaa aca 240
 Ser Glu Asn Val Lys Leu Pro Lys Gly Leu Gln Lys Lys Leu Glu Thr
 65 70 75 80
 gtc cgc gca aat aat aaa ctc cat att atc caa ttc aat gga cca att 288
 Val Pro Ala Asn Asn Lys Leu His Ile Ile Gln Phe Asn Gly Pro Ile
 85 90 95
 tta gaa gaa aca aaa cag cag ctg gaa aac aca ggg gca aag att ctc 336
 Leu Glu Glu Thr Lys Gln Gln Leu Glu Lys Thr Gly Ala Lys Ile Leu
 100 105 110
 gac tac ata cct gat tat gct tac att gtc gag tat ggg ggc gat gtt 384
 Asp Tyr Ile Pro Asp Tyr Ala Tyr Ile Val Glu Tyr Glu Gly Asp Val
 115 120 125
 aag tca gca aca agc acc att gag cac gtc gaa tcc gtc gag cct tat 432
 Lys Ser Ala Thr Ser Thr Ile Glu His Val Glu Ser Val Glu Pro Tyr
 130 135 140
 ttg cgc ata tac aga ata gat ccc cag ctt ttc aca aaa ggg gca tca 480
 Leu Pro Ile Tyr Arg Ile Asp Pro Gln Leu Phe Thr Lys Gly Ala Ser
 145 150 155 160
 gag ctt gla aac gca gtc ggc ctt gat aca aag cag aac aat aaa gag 528
 Glu Leu Val Lys Ala Val Ala Leu Asp Thr Lys Gln Lys Asn Lys Glu
 165 170 175

(56) WO 99/18218

305 310 315 320
 ttc agc caa gca tac agt gct ggt gcc aga att cat aca aac tcc tgg 1008
 Phe Ser Gln Ala Tyr Ser Ala Gly Ala Arg Ile His Thr Asn Ser Trp
 325 330 335
 gga gca gca gtc aat ggg gct tac aca aca gat tcc aga aat gtc gat 1056
 Gly Ala Ala Val Asn Gly Ala Tyr Thr Thr Asp Ser Arg Asn Val Asp
 340 345 350
 gac tat gtc cgc aaa aat gat atg acg atc ctt ttc gct gcc ggg aat 1104
 Asp Tyr Val Arg Lys Asn Asp Met Thr Ile Leu Phe Ala Ala Gly Asn
 355 360 365
 gaa gga cgc aac ggc gga acc atc agt gca cca ggc aca gct aaa aat 1152
 Glu Gly Pro Asn Gly Gly Thr Ile Ser Ala Pro Gly Thr Ala Lys Asn
 370 375 380
 gca ala aca gtc gga gct acg gaa aac ctc cgc cca agc ttt ggg tct 1200
 Ala Ile Thr Val Gly Ala Thr Glu Asn Leu Arg Pro Ser Phe Gly Ser
 385 390 395 400
 tat ggc gar aat atc aac cat gtc gca cag ttc tct tca cgt gga cgc 1248
 Tyr Ala Asp Asn Ile Asn His Val Ala Gln Phe Ser Ser Arg Gly Pro
 405 410 415
 aca aag gat gga cgc atc aaa cgc gat gtc atg gca cgc gga acg ttc 1296
 Thr Lys Asp Gly Arg Ile Lys Pro Asp Val Met Ala Pro Gly Thr Phe
 420 425 430
 ata cta tca gca aga tct tct ctt gca cgc gat tcc tcc ttc tgg ggc 1344
 Ile Leu Ser Ala Arg Ser Ser Leu Ala Pro Asp Ser Ser Phe Trp Ala
 435 440 445
 aac cat ggc agt aaa tat gca tac atg ggt gga acg tcc atg gct aca 1392

(55) WO 99/18218

gig caa tta aga ggc atc gaa caa atc gca caa ttc gca ata agc aat 576
 Val Gln Leu Arg Gly Ile Glu Glu Ile Ala Gln Phe Ala Ile Ser Asn
 180 185 190
 gat gtr cta tat att acg gca aag cct gag tat aag gtc atg aat gat 624
 Asp Val Leu Tyr Ile Thr Ala Lys Pro Glu Tyr Lys Val Met Asn Asp
 195 200 205
 gtt ggc cgt gga att gtc aaa ggc gat gtc gct cag agc agc tac ggg 672
 Val Ala Arg Gly Ile Val Lys Ala Asp Val Ala Gln Ser Ser Tyr Gly
 210 215 220
 ttg tat gga caa gga cag atc gla ggc gtt gcc gat aca ggg ctt gat 720
 Leu Tyr Gly Gln Gly Gln Ile Val Ala Val Ala Asp Thr Gly Leu Asp
 225 230 235 240
 aca ggt cgc aat gac agt tgc atg cat gaa gcc ttc cgc ggg aaa att 768
 Thr Gly Arg Asn Asp Ser Ser Met His Glu Ala Phe Arg Gly Lys Ile
 245 250 255
 act gca tta tat gca ttg gga cgc agc aat aat gcc aat gat agc aat 816
 Thr Ala Leu Tyr Ala Leu Gly Arg Thr Asn Asn Ala Asn Asp Thr Asn
 260 265 270
 ggt cat ggt acg cat gtc gct ggc tcc gla tta gga aac ggc tcc act 864
 Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Ser Val Leu Gly Asn Gly Ser Thr
 275 280 285
 aat aaa gga atg ggc cct cag ggc aat cta gtc ttc caa tct atc atg 912
 Asn Lys Gly Met Ala Pro Gln Ala Asn Leu Val Phe Gln Ser Ile Met
 290 295 300
 gat agc ggt ggg gga ctt gga gga cta cct tgc aat ctg caa acc tta 960
 Asp Ser Gly Gly Gly Leu Gly Gly Leu Pro Ser Asn Leu Gln Thr Leu

(57) WO 99/18218

Asn His Asp Ser Lys Tyr Ala Tyr Met Gly Gly Thr Ser Met Ala Thr
 450 455 460
 ccg atc gtt gct gga aac gtc gca cag ctt cgt gag cat ttt gtc aac 1440
 Pro Ile Val Ala Gly Asn Val Ala Gln Leu Arg Glu His Phe Val Lys
 465 470 475 480
 aac aga ggc atc aca cca aag cct tct cta tta aac ggc gca ctg att 1488
 Asn Arg Gly Ile Thr Pro Lys Pro Ser Leu Leu Lys Ala Ala Leu Ile
 485 490 495
 gcc ggt gca gct gac atc ggc ctt ggc tac cgc aac ggt aac caa gga 1536
 Ala Gly Ala Ala Asp Ile Gly Leu Gly Tyr Pro Asn Gly Asn Glu Gly
 500 505 510
 tgg gga cga gtc aca ttg gat aac tcc ctg aac gtt gcc tat gtc aac 1584
 Trp Gly Arg Val Thr Leu Asp Lys Ser Leu Asn Val Ala Tyr Val Asn
 515 520 525
 gag tcc agt tct cta tcc acc agc caa aaa ggc acg tac tgc ttt act 1632
 Glu Ser Ser Ser Leu Ser Thr Ser Gln Lys Ala Thr Tyr Ser Phe Thr
 530 535 540
 gct act gcc ggc aag cct ctg aaa atc tcc ctg gla tgg tct gat gcc 1680
 Ala Thr Ala Gly Lys Pro Leu Lys Ile Ser Leu Val Trp Ser Asp Ala
 545 550 555 560
 cct ggc agc aca act gct tcc gla acg ctt gtc aat gat ctg gat ctt 1728
 Pro Ala Ser Thr Thr Ala Ser Val Thr Leu Val Asn Asp Leu Asp Leu
 565 570 575
 gtc att acc gct cca aat ggc aca cag tat gla gga aat gat ttt act 1776
 Val Ile Thr Ala Pro Asn Gly Thr Gln Tyr Val Gly Asn Asp Phe Thr
 580 585 590

(58)

WO 99/18218

t c g c c a t a c a a t g a t a a c t g g g a t g g c c g c a a t a a c g t a g a a a a t g t a 1824
 S e r P r o T y r A s n A s p A s n T r p A s p G l y A r g A s n A s n V a l G l u A s n V a l
 595 600 605
 t t t a t t a a t g c a c c a c a n a g c g g g a c g t a t a c a a t t g a a g t a c a g g c t 1872
 P h e I l e A s n A l a P r o G l n S e r G l y T h r T y r T h r I l e G l u V a l G l n A l a
 610 615 620
 t a t a a c g t a c c g g t t g g a c c a c a g a a c t t c t c g t t g c a a t t g t g a a t 1920
 T y r A s n V a l P r o V a l G l y P r o G l n A s n P h e S e r L e u A l a I l e V a l A s n
 625 630 635 640
 1 a a 1923

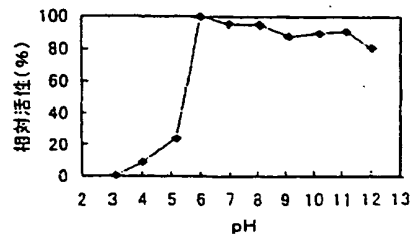
【図面の簡単な説明】

図1は、アルカリプロテアーゼKP43のpHプロファイルを示す。図2は、アルカリプロテアーゼKP43のpH安定性(40℃、30分)を示す。図3は、アルカリプロテアーゼKP43のpH安定性(10℃、24時間)を示す。図4は、アルカリプロテアーゼKP43の温度プロファイルを示す。図5は、アルカリプロテアーゼKP43の耐熱性を示す。図6は、KP43プロテアーゼの酸化剤(50mM過酸化水素)に対する安定性を示す。図7は、KP9860プロテアーゼ及びその部分分解物のN末端配列を示す。図8は、KP9860プロテアーゼのN末端配列からデザインしたプライマー配列を示す。図9は、57bp PCR増幅断片とプライマーデザインを示す。

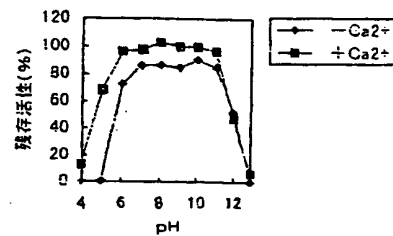
(59)

WO 99/18218

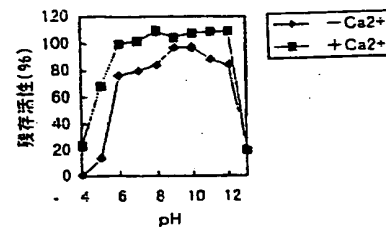
【図1】



【図2】



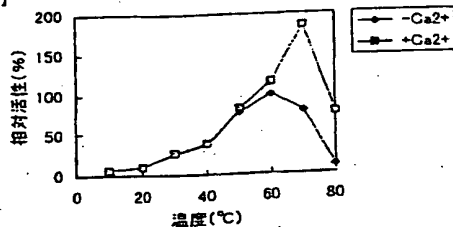
【図3】



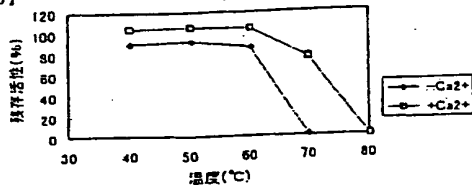
(60)

WO 99/18218

【図4】



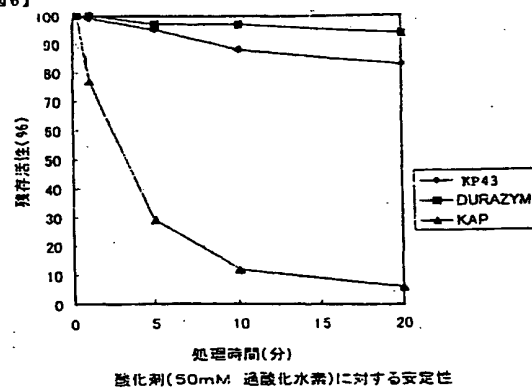
【図5】



(61)

WO 99/18218

【図6】



【図7】

KP-9860プロテアーゼ N末端配列	NOVARHIVKADVAQSSYGLY
15kDa部分分解物のN末端配列	GIVKADVAQSSYGL
18kDa部分分解物のN末端配列	IKPDVNAQGTYYL
25kDa部分分解物のN末端配列	NAITVGATENLRPSFGSYAD
28kDa部分分解物のN末端配列	KNDHVFLEAAGNEGPN

(52)

WO99/18218

[88]

I V K A D V A Q

9860-N2 5' ATT GTT AAA GCT GAT GTT GCT CAA 3'
 C C G C C G C G
 A A A A A A
 G G G G G G

9860-18k-RV 3' TAT TTT GGT CTA CAT TAC CGT GG 5'
 A C C G C C C
 G A G G G A G

I K F D V M A P

9860-18k 5' ATT AAA CCT GAT GTT ATG GCT CC 3'
 C G C C C C C
 A A A A A A
 G G G G G G

9860-25k-RV 3' TTA CGT TAT TGT CAT CCT CGT TGT 5'
 G C A C C C C C
 A G A A A A A A
 G G G G G G G G

M A I T V G A T E M

9860-25k 5' ATT ACT GTT GGT GCT ACT GAA AA 3'
 C C C C C C C G
 A A A A A A A
 G G G G G G G

9860-28k-RV 3' TTA CTA TAC CAT TAT AAT AAA GG 5'
 G G C A G C G
 A G A G A G
 G G G G G G

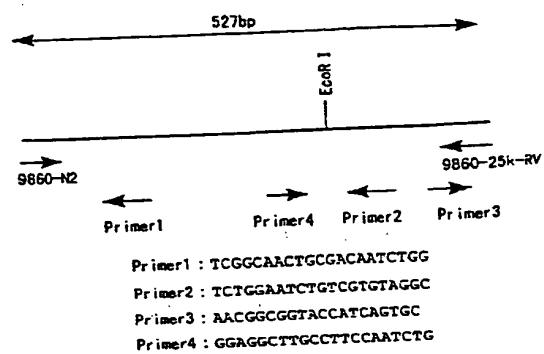
E D M V I L F A

9860-28k 5' AAT GAT ATG GTT ATT TTT TTT GC 3'
 C C C C C C C
 A A A A A A
 G G G G G G

(63)

WO99/18218

[89]



フロントページの続き

- (72)発明者 久保田 浩美
栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会
社 研究所内
- (72)発明者 影山 泰
栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会
社 研究所内
- (72)発明者 人見 潤
茨城県鹿島郡神栖町東深芝20 花王株式会
社 研究所内
- (72)発明者 四方 資通
和歌山県和歌山市湊1334 花王株式会社
研究所内
- (72)発明者 野村 昌史
和歌山県和歌山市湊1334 花王株式会社
研究所内

(注) この公表は、国際事務局 (W I P O) により国際公開された公報を基に作成したものである。

なおこの公表に係る日本語特許出願 (日本語実用新案登録出願) の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項 (実用新案法第48条の13第2項) により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。